

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zum Rekrutierungsmechanismus und zur funktionellen Rolle des atypischen Myr5 bei der Epithelzellinvasion durch *Shigella flexneri*

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
Universitätsmedizin Berlin

von
Christian Böwe
aus Parchim

Dekan: Prof. Dr. J. W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr. U. Göbel

2. Prof. Dr. M. A. Schmidt

3. PD Dr. W. Heise

Datum der Promotion: 19.04.2004

Veröffentlichung: Graf, B., Bähler, M., Hilpelä, P., Böwe, C., Adam, T. 2000. Functional role for the class IX myosin myr5 in epithelial cell infection by *Shigella flexneri*. *Cellular Microbiology* **2**: 601-616

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1.	Bakterien	5
1.2.	<i>Shigellen</i>	6
1.3.	Problemstellung	9
2.	Materialien und Methoden	14
2.1.	Materialien	14
2.2.	Verwendete Myr5- und Rho-Konstrukte	14
2.3.	Bakterienstämme	14
2.4.	Zellkultur	15
2.5.	Transfektion von HeLa-Zellen	16
2.6.	Infektion	17
2.6.1	Infektion mit <i>Shigella flexneri</i> SC301 oder SC300	17
2.6.2	Infektion mit <i>Shigella flexneri</i> M90T, BS176 oder SC560	17
2.7.	Färbungen	18
2.7.1	Immunfluoreszenzfärbung	18
2.7.2	GIEMSA-Färbung	20
2.8.	Mikroskopieren	20
2.9.	DNA-Transformation, -Gewinnung, -Reinigung und -Präzipitation	20
2.9.1	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	20
2.9.2	DNA-Transformation in <i>E.coli</i> -DH ₅ α -Zellen	21
2.9.3	DNA-Gewinnung	21
2.9.4	DNA-Reinigung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion	22
2.9.5	Ethanolpräzipitation	23
2.10.	Herstellung des Myr5-VSV-tag-Konstruktes	23
2.10.1	Schema der Vorgehensweise	24
2.10.2	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	24
2.10.3	Gelelektrophorese	25
2.10.4	Gelextraktion, Dephosphorylierung, Präzipitation kleiner DNA-Fragmente	26
2.10.5	Oligonukleotidhybridisierung	28
2.10.6	Ligation	28
3.	Ergebnisse	30
3.1.	Änderung der Zellmorphologie durch Überexpression von Myr5	30

3.2.	Rekrutierung von Myr5 in die Invasionszone und Kolokalisation von Myr5 und Aktin an der bakteriellen Eintrittsstelle	31
3.3.	Von der Myosin-Funktion unabhängige Myr5-Rekrutierung in die bakterielle Invasionszone	34
3.3.1	Myr5-Rekrutierung ist unabhängig von der ATP-Bindung	34
3.3.2	Myr5-Rekrutierung ist unabhängig von der ATPase-Aktivität	36
3.4.	Rekrutierungsverhalten von Myr5 und Rho	38
3.5.	Von der GAP-Funktion unabhängige Myr5-Rekrutierung in die bakterielle Invasionszone	40
3.6.	Einheitliche Rekrutierung von Myr5 und Myr5-GAP ⁻	42
3.7.	Verringerung der Infektionseffizienz durch Myr5	45
3.8.	Steigerung der Infektionseffizienz durch Myr5-GAP ⁻	48
4.	Diskussion	51
4.1.	Diskussion der Methoden	51
4.1.1	Verwendete Zelllinie	51
4.1.2	Transfektionsmethode	51
4.1.3	Auswahl der Bakterienstämme	52
4.1.4	Quantitative Invasionsexperimente	52
4.1.5	Konstrukt Myr5-VSV-tag	53
4.2.	Untersuchungen zum Rekrutierungsmechanismus von Myr5 während der Epithelzellinvasion durch <i>Shigella flexneri</i>	54
4.3.	Untersuchungen zur funktionellen Rolle von Myr5 während der Epithelzellinvasion durch <i>Shigella flexneri</i>	57
5.	Zusammenfassung	66
6.	Literaturverzeichnis	68
	Abkürzungsverzeichnis	78
	Lebenslauf	80
	Danksagung	81
	Selbständigkeitserklärung	82

1. Einleitung

1.1. Bakterien

Bakterien sind einzellige Mikroorganismen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,5-5 μm . Zahlreiche apathogene Bakterienarten besiedeln den Menschen permanent und sind Bestandteil der Normalflora. Diese Normalflora übernimmt beim Menschen eine Reihe von Funktionen. Als Komponente des physiologischen Abwehrsystems bildet sie eine Kolonisationsresistenz und schützt so den Organismus vor einer Besiedlung durch pathogene Erreger.

Ob sich aus einer Kolonisation mit einem pathogenen Erreger eine manifeste Krankheit entwickelt, hängt im Wesentlichen von den pathogenen Eigenschaften des Mikroorganismus und von der Abwehrlage des Wirtes ab. So wird zwischen fakultativ pathogenen Erregern, die nur unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. einer geschwächten Abwehrlage des Wirtes, zu einer Infektionskrankheit führen, und obligat pathogenen Erregern, deren Anwesenheit nahezu immer eine manifeste Krankheit bedingt, unterschieden.

Um eine Infektion verursachen zu können, müssen zahlreiche pathogene Bakterien zunächst verschiedene physische und biochemische Barrieren überwinden. So stellt etwa die Haut bzw. im Inneren des Körpers die Schleimhaut ein wesentliches Hindernis für pathogene Keime dar. Können sich diese dennoch an die Oberfläche von Epithelzellen anlagern und dort vermehren oder gelingt es ihnen, in tiefere Gewebe einzudringen, so müssen sie sich mit dem Immunsystem des Menschen auseinandersetzen. Dabei sind Phagozyten, z.B. Granulozyten und "Natürliche Killerzellen", die größere Partikel wie Mikroorganismen, Fremdkörper oder Zelltrümmer eliminieren können, Teil des unspezifischen, zellulären, Antigen-unabhängigen Immunsystems. Zu diesem System gehört auch das Komplementsystem, das fremde Zellen lysieren oder den zur Phagozytose fähigen Zellen zugänglich machen kann. Das unspezifische, angeborene Immunsystem reagiert schnell und ist ein eminent wichtiger, früher Abwehrmechanismus. Die Aktivierung des spezifischen, humoralen, Antigen-abhängigen Immunsystems, das in erster Linie durch die B- und T-Lymphozyten vermittelt wird, resultiert u.a. in der Bildung von Erreger-spezifischen Antikörpern und Gedächtniszellen. Dieses adaptative System reagiert verzögert und schützt den Organismus im Verlauf von lang andauernden bzw. über das "immunologische Gedächtnis" bei erneuten Infektionen mit einem Erreger.

Bakterien können im Wesentlichen in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen gibt es die große Gruppe der Bakterien, deren Wachstum und Vermehrung auf den extrazellulären Raum beschränkt sind. Dabei kann diese Gruppe noch einmal unterteilt werden in die extrazellulär wachsenden Eitererreger, z.B. *Staphylococcus aureus*, und die Exotoxinbildner, z.B. *Clostridium tetani*, deren typisches Krankheitsbild durch die bakteriellen Toxine hervorgerufen wird.

Zum anderen gibt es die Gruppe der fakultativ bzw. obligat intrazellulären Bakterien. Diese haben die Fähigkeit, in Zellen einzudringen und sich in diesen zu vermehren. Dabei erfolgt die Aufnahme der Bakterien in die Zelle auf der einen Seite durch “professionelle“ Phagozyten wie Makrophagen oder Granulozyten. Auf der anderen Seite können diese Bakterien bei Zellen, die nicht zur “professionellen“ Phagozytose fähig sind, wie z.B. Epithelzellen, unter Ausnutzung physiologischer Reaktionskaskaden zelluläre Zytoskelettveränderungen induzieren, die eine Internalisierung der Bakterien zur Folge haben (1, 2). Die meisten dieser Bakterienarten, z.B. *Salmonella typhimurium* (3), bleiben intrazellulär von einer Vakuole umschlossen (4, 5). Nur wenige Bakterienarten können diese Vakuole verlassen und sich somit frei im Zytoplasma bewegen und vermehren. Dies wurde bisher nur für drei Bakteriengattungen beschrieben (6). Dazu gehören die obligat intrazellulären *Rickettsienarten* (7), die u.a. verschiedene Arten des Fleck- und Zeckenbissfiebers verursachen, sowie die fakultativ intrazellulären *Listerienarten* (8) und *Shigellen* (9, 10).

Rickettsien, *Listerien* und *Shigellen* besitzen zahlreiche Virulenzfaktoren, die ihnen eine Besiedlung des intrazytoplasmatischen Raumes ermöglichen. Etwa um sich intrazytoplasmatisch bewegen und vermehren zu können, interagieren *Shigellen* und *Listerien* mit wirtseigenen Molekülen, die in Abwesenheit des Parasiten physiologische Funktionen in der Zelle erfüllen. Ein Beispiel hierfür liefert die intrazytoplasmatische Bewegung von *Shigella flexneri* und *Listeria monocytogenes*. Diese basiert auf einer bakterieninduzierten, gerichteten Aktinpolymerisation (11, 12, 13, 14).

Doch obwohl mittlerweile viele dieser bakteriellen Virulenzfaktoren charakterisiert werden konnten, sind die vielfältigen Interaktionen zwischen intrazellulären Bakterien und ihren Wirtszellen bis heute nicht völlig verstanden.

1.2. Shigellen

Shigellen sind Gram-negative, unbegeißelte Stäbchenbakterien, die für den Menschen pathogen sind. Nach der alten Nomenklatur bildet *Shigella* eine eigenständige Gattung mit

den in Tab. 1 aufgeführten Spezies. Neuerer Nomenklatur zufolge sind *Shigellen* Klone der Spezies *Escherichia coli* (15, 16, 17, 18). Aus historischen Gründen und aufgrund der noch nicht weltweit anerkannten neuen Nomenklatur wird in dieser Arbeit die alte Nomenklatur beibehalten.

Tab. 1: Klassifikation der Gattung *Shigella*, die neueren Nomenklaturen zufolge der Spezies *Escherichia coli* angehört (15, 16, 17, 18).

Shigellenspezies	Anzahl der Serotypen	Geographische Verbreitung
<i>Shigella flexneri</i>	6	weltweit
<i>Shigella sonnei</i>	1	weltweit
<i>Shigella boydii</i>	18	Vorderasien, Nordafrika
<i>Shigella dysenteriae</i>	13	tropische und subtropische Gebiete

Der Mensch, das einzige bekannte Erregerreservoir, infiziert sich vorwiegend durch die Aufnahme von kontaminiertem Wasser bzw. kontaminierten Lebensmitteln. Bereits eine Infektionsdosis von weniger als 100 Bakterien reicht aus, um eine Shigellose auszulösen (19). Diese auch als bakterielle Ruhr bezeichnete Krankheit entspricht einer Kolitis und wird im Wesentlichen durch die häufigen, stark wässrigen Stuhlentleerungen, die Schleim- und Blutbeimengungen enthalten können und die dadurch hervorgerufenen Symptome des starken Flüssigkeitsverlustes charakterisiert. Bakterielle Exotoxine, wie z.B. das Shiga-Toxin, scheinen nur bei einer Infektion mit *Shigella dysenteriae* von Bedeutung zu sein (20).

Nach der oralen Aufnahme des Erregers in den Gastrointestinaltrakt werden zunächst kolonständige M-Zellen mit *Shigella flexneri* infiziert (21, 22). Diese tragen keine Mikrovilli und bilden das Epithel über den Peyer-Plaques, wo sie in enger räumlicher und funktioneller Beziehung zu Lymphozyten und Makrophagen stehen. Die M-Zellen sind für die Aufnahme körperfremden Materials von Bedeutung und dienen einer Reihe von enteroinvasiven Mikroorganismen als Eintrittspforte (23). *Shigellen* durchwandern die M-Zellen und infizieren benachbarte Makrophagen, die durch *Shigellen*-induzierte Apoptose abgetötet werden. Dabei wird Interleukin-1 freigesetzt (24, 25). Dieses inflammatorisch und pyrogen wirkende Protein scheint für eine effiziente Infektion bedeutungsvoll zu sein. So wurde gezeigt, dass eine Inhibition der Interleukin-1-vermittelten Signaltransduktion zu einer Verminderung der Bakterienanzahl im infizierten Gewebe führt (21, 26). Die Bakterien

können Enterozyten nur vom basolateralen Pol her infizieren (27). Dies kann entweder direkt über unmittelbar angrenzende M-Zellen oder über infizierte Makrophagen erfolgen. Ein zweiter potentieller Mechanismus erlaubt es den *Shigellen*, die Enterozyten vom basolateralen Pol her zu infizieren. Dabei nutzen die *Shigellen* die Dehiszenz aus, die polymorphkernige Leukozyten zwischen den Epithelzellen verursachen, wenn sie sich zwischen diese drängen. Diese "Lücke" ermöglicht es den Bakterien, zwischen die Enterozyten zu gelangen und diese anschließend vom basolateralen Pol her zu infizieren (28). Kürzlich gewonnene Ergebnisse deuten darauf hin, dass *Shigellen* diesen Mechanismus möglicherweise kontrollieren, indem sie die Migration der polymorphkernigen Leukozyten ins Epithel induzieren. So wurde gezeigt, dass an der apikalen Oberfläche sezernierte Lipopolysaccharide (LPS) von *Shigella* transzellulär in den basolateralen Interzellulärraum gelangen und dadurch zu einer verstärkten Einwanderung polymorphkerniger Leukozyten ins Epithel führen (29).

Nach der Epithelzellinvasion induzieren die *Shigellen* die Lyse der Vakuolenmembran (10), wodurch sie sich frei im Zytoplasma der Wirtszelle bewegen und vermehren können. Die Bakterien können von Zelle zu Zelle "wandern", ohne mit dem extrazellulären Milieu in Kontakt kommen zu müssen und infizieren so auch benachbarte Enterozyten (1, 30). Bei der interzellulären Ausbreitung induzieren *Shigellen* die Ausbildung von fingerförmigen Protrusionen, die von benachbarten Zellen aufgenommen werden (30). Anschließend erfolgt die Lyse der Doppelmembran, so dass sich die *Shigellen* wieder frei im Zytoplasma befinden (31).

Bei der intrazellulären Bewegung können zwei unterschiedliche Bewegungsarten beobachtet werden, wobei die eine IcsA-abhängig und die andere IcsA-unabhängig ist (7). IcsA ist ein sezerniertes, bakterielles Protein, das ATP binden kann und in vitro ATPase-Aktivität zeigt (32). Der von diesem Protein abhängige Bewegungstyp ist charakterisiert durch eine an einem Ende des Bakteriums lokalisierte, polarisierte Induktion von Aktinpolymerisation. Diese komplexe, dynamische Zytoskelettstruktur führt zur Ausbildung von Aktinbündeln, die die Bakterien intrazytoplasmatisch vorwärtsschieben (30, 33). Diese IcsA-abhängige Bewegung ist für die Ausbildung einer Erkrankung essentiell. IcsA-negative Mutanten waren nicht mehr in der Lage, eine Shigellose zu verursachen (34). Bei dem anderen, IcsA-unabhängigen Mechanismus, bewegen sich die *Shigellen* entlang von präexistenten Mikrofilamenten oder Stressfasern (35, 36). Die pathophysiologische Bedeutung dieses Bewegungstyps ist bisher ungeklärt.

Die Infektion mit *Shigella flexneri* erfolgt in sechs Schritten:

1. orale Aufnahme des Erregers
2. Epithelzellinvasion
3. intrazytoplasmatische Vermehrung
4. Ausbreitung von Zelle zu Zelle
5. granulozytäre Demarkierung des Infektionsortes
6. Ausscheidung des Erregers mit dem Stuhl.

1.3. Problemstellung

Intrazelluläre Erreger haben die Fähigkeit entwickelt, in physiologische Vorgänge ihrer Wirtszelle einzugreifen, diese zu steuern und auszunutzen. Die Interaktionen zwischen intrazellulären Parasiten und ihren Wirtszellen sind für die Pathogenität dieser Mikroorganismen von entscheidender Bedeutung. Die Erforschung dieser Prozesse dient somit einerseits der Aufklärung von Pathogenitätsmechanismen und ist dadurch eine Grundlage für die Entwicklung von Strategien zur Bekämpfung und Verhütung dieser Infektionskrankheiten und führt andererseits zu einem besseren Verständnis physiologischer, zellbiologischer Vorgänge innerhalb von eukaryoten Zellen.

Ein Beispiel für eine derartige Interaktion zwischen Wirtszelle und Erreger stellt die Infektion von Epithelzellen durch *Shigella flexneri* dar. Dabei koordiniert und reguliert *Shigella* Proteine der Wirtszelle u.a. zur bakteriellen Invasion, zur intrazellulären Bewegung und zur interzellulären Ausbreitung (9, 37, 38). Das Ausnutzen der Wirtszelle kann am Beispiel der Epithelzellinvasion, die ein wesentlicher Virulenzfaktor von *Shigella* ist (39), besonders gut dargestellt werden. Nach dem Kontakt mit Epithelzellen induziert *Shigella* über eine gezielte Steuerung zellulärer Proteine die Ausbildung einer blütenartigen Membranstruktur mit Pfeilerarchitektur. Die Pfeiler werden durch zelluläre Protrusionen gebildet und untereinander durch die Zytoplasmamembran verbunden. Schließlich konfluiert die Zytoplasmamembran über dem Bakterium und internalisiert es (9, 40, 41).

Nach dem Kontakt mit der Epithelzellmembran sezernieren *Shigellen* zunächst vier Ipa-Proteine (invasion plasmid antigen) (42). Während IpaB, IpaC und IpaD essentiell für die bakterielle Invasion sind (43, 44), spielt IpaA eine Rolle bei der Koordination der bakteriell induzierten Zytoskelettveränderungen und erhöht dadurch möglicherweise die Invasionseffizienz (45). IpaD ist ein entscheidender Regulator der bakteriellen Sekretion der

Ipa-Proteine (46). IpaB und IpaC bilden im Extrazellulärraum den sogenannten Ipa-Komplex, der die Aufnahme von Bakterien und auch anderen Partikeln induziert (44, 47). So werden mit dem Ipa-Komplex gekoppelte Latexpartikel ebenfalls von Epithelzellen internalisiert (44). Der Proteinkomplex aus IpaB und IpaC führt nach dem initialen Membrankontakt über eine IpaC-abhängige Aktivierung der GTPasen CDC42 und Rac zunächst zur Bildung von Aktinnukleationszonen seitlich sowie unterhalb des bakteriellen Kontaktes (48). Die seitlich der bakteriozellulären Kontaktzone gelegenen Nukleationszonen werden in Abhängigkeit von Rho, einer weiteren GTPase, durch kontinuierliche Aktinpolymerisation zu zellulären Protrusionen, wobei die negativen Enden der Aktinfilamente zum Zellinneren zeigen, während die positiven Enden der Aktinfilamente zur Plasmamembran gerichtet sind (9, 44, 41, 49). Die Nukleationszonen direkt unterhalb des Bakteriums entwickeln sich möglicherweise IpaA-abhängig nicht zu Protrusionen (41, 50).

Die bakteriell induzierte Aktinpolymerisation ist essentiell für die Invasion von *Shigella* (9, 40). So kann durch Cytochalasin B, einen Inhibitor der Aktinpolymerisation, die bakterielle Invasion gehemmt werden (51). Mehrere Proteine besitzen eine funktionelle Rolle bei diesen bakterieninduzierten Rearrangements des Zytoskeletts, z.B. T-Plastin (41), ein aktinbündelndes Protein, das für die gerichtete Aktinpolymerisation von Bedeutung und für die bakterielle Invasion essentiell ist (41), sowie Ezrin (52) und die bereits genannten GTPasen der Rho-Gruppe Rac, CDC42 und Rho (37, 53).

Rho ist eine GTPase, die für die Organisation des Zytoskeletts allgemein von großer Bedeutung ist. So reguliert Rho u.a. die Bildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionsplaques (54, 55, 56). Des Weiteren spielt Rho eine wichtige Rolle im Phospholipidstoffwechsel (57, 58).

Für die Epithelzellinvasion von *Shigella flexneri* ist Rho essentiell (37, 59). Dies zeigte sich dadurch, dass bei HeLa-Zellen, die mit dem Rho-spezifischen Inhibitor *Clostridium botulinum* Exoenzym C3 behandelt wurden (60), eine 87%ige Inhibition der Shigelleninvasion nachgewiesen wurde (37). Während der Invasion wird Rho zur bakteriellen Eintrittsstelle rekrutiert (37). Dort stabilisiert und bündelt Rho filamentäres Aktin (61), das an der bakteriellen Eintrittsstelle aus monomerem Aktin polymerisiert.

Es ist daher notwendig, dass die Rho-Aktivität während der Epithelzellinvasion durch *Shigella* gezielt gesteuert wird. Rho unterliegt einem Zyklus zwischen einem aktiven und einem inaktiven Zustand. Dieser Zyklus wird durch GTPase-activating proteins (GAP-Proteine), GDP/GTP exchange factors (GEF-Proteine) und guanine nucleotide dissociation

inhibitor (GDI-Protein) reguliert. Während GAP-Proteine Rho von einem GTP-gebundenen, aktiven Zustand in einen GDP-gebundenen, inaktiven Zustand überführen, fördern GEF-Proteine die Bildung von GTP-gebundenem, aktiven Rho aus GDP-gebundenem, inaktiven Rho. Ist Rho mit dem GDI-Protein assoziiert, so wird der GDP-gebundene Zustand stabilisiert, was einer Aktivierung von Rho entgegenwirkt (62, siehe Abb. 1).

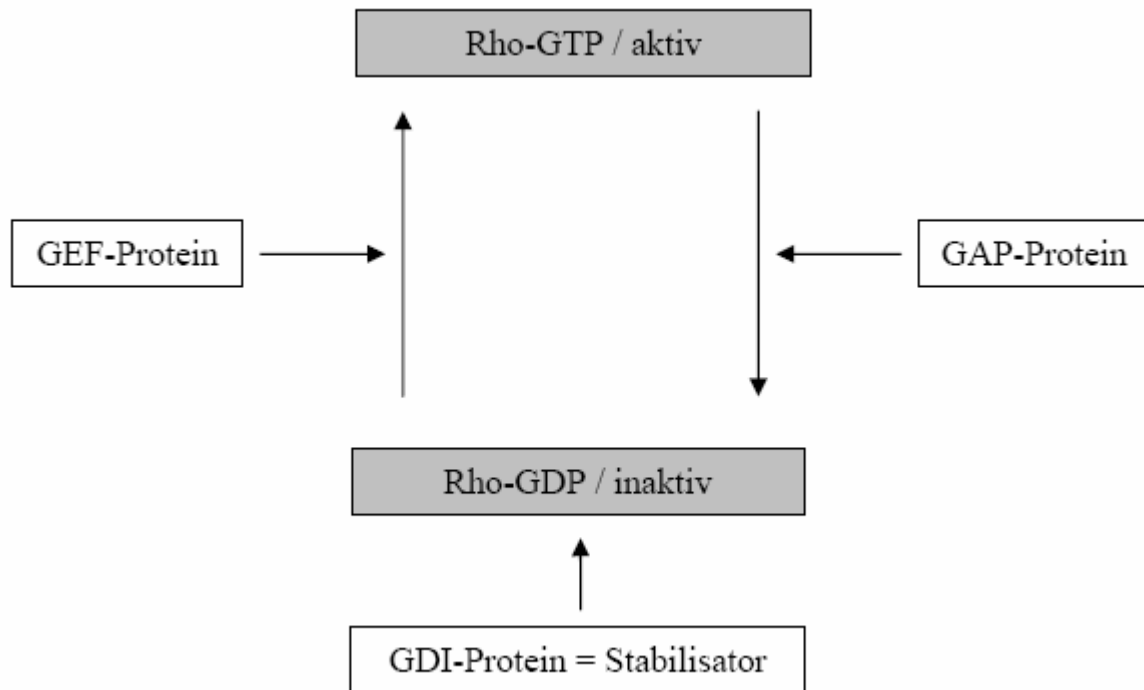


Abb. 1: Rho-Zyklus zwischen dem GDP-gebundenen, inaktiven Zustand und dem GTP-gebundenen, aktiven Zustand. GEF-Proteine aktivieren Rho, GAP-Proteine inaktivieren Rho. GDI-Protein stabilisiert GDP-gebundenes, inaktives Rho.

Shigella induziert während der Invasion eine Rho-Aktivierung, die essentiell für die Ausbildung der zur Bakterienaufnahme führenden Zytoskelettveränderungen ist (37). Wie die Aktivierung von Rho im Detail erfolgt, ist bisher ungeklärt. Aufgrund der Beobachtung, dass sich die blütenartige Membranstruktur unmittelbar nach der Aufnahme des Bakteriums zurückbildet, kann man annehmen, dass die Rho-Aktivierung zeitlich streng begrenzt ist. Wir vermuteten daher, dass Rho-Antagonisten an der Regulation der Rho-abhängigen Zytoskelettveränderungen funktionell von Bedeutung sein könnten. Im Rahmen der Überlegungen zur Regulation der Rho-Aktivität stellte Myr5, ein nicht konventionelles Myosin, ein mögliches Bindeglied zwischen Rho und dem Zytoskelett dar.

Myr5 (fifth unconventional myosin from rat) ist das erste bekannte Myosin mit einem GAP-Modul (63). Es ist ein Protein mit einer relativen Molekülmasse von 225 kDa und besteht aus 1980 Aminosäuren (63, siehe Abb. 2).

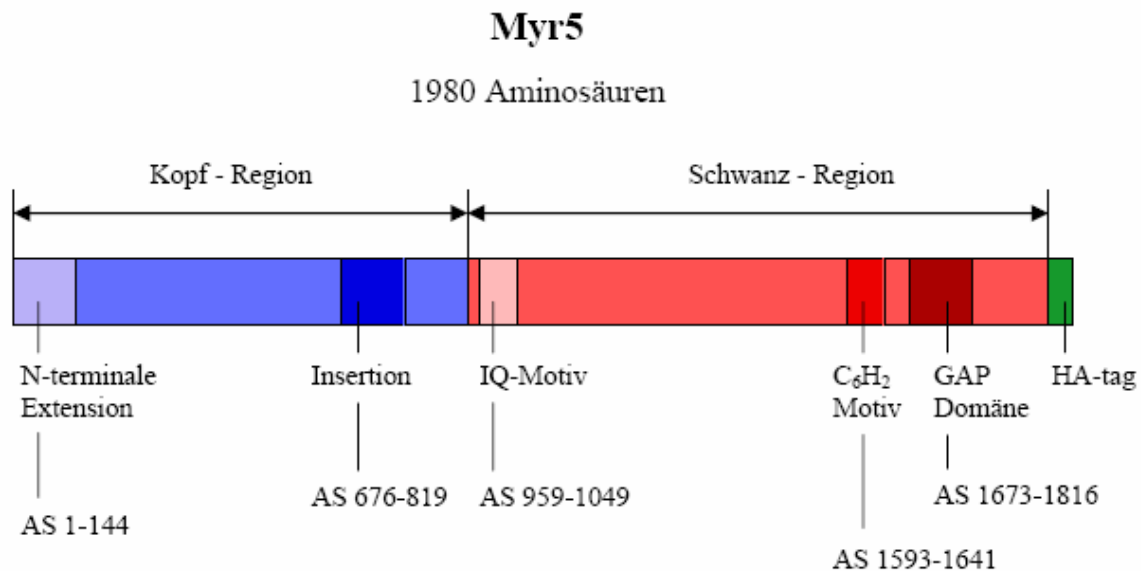


Abb. 2: Schematische Darstellung des Myr5-Moleküls (63). Die hervorgehobenen Sequenzen sind für Myr5 spezifisch und werden im konventionellen Myosin des Muskels nicht gefunden.

Myr5 konnte in Rattengewebe isoliert werden und gehört zur Myosinklasse IX. In den letzten Jahren sind eine Vielzahl “neuer” Myosine entdeckt worden. Diese werden in 18 Klassen eingeteilt (64). Dabei wird das Myosin des Muskels, Myosinklasse II, als “konventionelles” Myosin bezeichnet. Die Myosine der anderen Klassen bilden die Gruppe der sogenannten “nicht konventionellen” Myosine (65). Alle Myosine haben eine ähnliche Kopf-Region, über die sie ATP-abhängig mit Aktin interagieren. Die Myosine der einzelnen Klassen besitzen jedoch unterschiedliche Schwanz-Regionen, wodurch den nicht konventionellen Myosinen verschiedene Funktionen zukommen. Unter anderem wird den Myosinen eine Beteiligung bei der Zellbewegung (Myosinklasse I), bei der Endo- und Exozytose (Myosinklasse I, V), bei der Phagozytose (Myosinklasse I), beim Intrazellulärtransport (Myosinklasse V, VI) und bei der Signaltransduktion (Myosinklasse I, IX) zugeschrieben (65, 66, 67, 68). Auch für die Sinnesfunktionen Sehen, Hören und Gleichgewichtssinn sind Myosine (Myosinklasse I, III, VI, VII) essentiell (65, 69).

Charakteristisch für die Myosine der Klasse IX ist die GAP-Domäne in der Schwanz-Region des Proteins. Myr5 kann an Rho binden und Rho sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mittels des GAP-Moduls inaktivieren (63). Auch für das humane Myosin-IXb und das in Rattengewebe isolierte Myr7, die ebenfalls der Myosinklasse IX angehören und eine hohe Homologie zu Myr5 aufweisen, konnte gezeigt werden, dass sie Rho mittels ihrer GAP-Module inaktivieren können (63, 70, 71, 72).

Ob Myr5 mit Aktin ATP-abhängig interagieren kann, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Es gibt jedoch experimentelle Hinweise, die für eine solche Interaktion zwischen Aktin und Myr5 sprechen. So führten Reinhard et al. (63) Co-Sedimentationsexperimente mit dem Ergebnis durch, dass Myr5 ATP-abhängig an Aktin binden kann. Demgegenüber zeigten die von Mooseker et al. (71) durchgeführten Co-Sedimentationsexperimente mit dem humanen Klasse IX-Myosin, Myosin-IXb, eine ATP-unabhängige Aktinbindung. Ob Myr5 und das humane Myosin-IXb tatsächlich auf verschiedene Art und Weise mit Aktin interagieren oder ob die unterschiedlichen Resultate auf die ungleichen experimentellen Bedingungen zurückzuführen sind, bleibt noch zu klären.

Myr5 kann somit sowohl mit Rho als auch mit Aktin interagieren und stellt dadurch eine direkte Assoziation von Rho mit dem Zytoskelett her. Wir vermuteten daher, dass das GAP-Protein Myr5 während der Shigelleninvasion funktionell von Bedeutung sein könnte. So spekulierten wir zum einen, dass Myr5 als aktives Motorprotein für Rho fungieren könnte. Diese Hypothese gründet u.a. auf der Tatsache, dass für das humane Klasse-IX-Myosin, Myosin-IXb, eine aktive Bewegung entlang von Aktinfilamenten beschrieben wurde (71). Zum anderen könnte Myr5 mittels seines GAP-Moduls als Rho-Antagonist funktionell von Bedeutung sein.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es daher, die Bedeutung des Rho-Antagonisten Myr5 bei der Epithelzellinvasion durch *Shigella flexneri* aufzudecken.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Reinheitsgrade “p.a.” bzw. “reinst” der Firmen ALDRICH, BAKER, FLUKA, GIBCO, MERCK, ROTH, SIFIN und SIGMA verwendet. Alle Lösungen wurden in Aqua bidest. angesetzt. Die Medien und Pufferlösungen wurden autoklaviert (20 Minuten, 120°C) oder steril filtriert (0,2 µm).

2.2. Verwendete Myr5- und Rho-Konstrukte

Die für die Untersuchungen verwendeten Myr5-Konstrukte erhielten wir von Prof. Martin Bähler, Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik, Westfälische Wilhelms-Universität, Schlossplatz 5, 48149 Münster. Die Myr-5-Konstrukte besitzen C-terminal ein HA-tag (tag = Markersequenz) und unterscheiden sich von Myr5 wie folgt:

- Myr5-225: Mutante der ATPase-Aktivität; Austausch der Aminosäure 295 von Arginin durch Cystein
- Myr5-248: Mutante der ATP-Bindungsstelle; Austausch der Aminosäure 244 von Glyzin durch Arginin
- Myr5-250: Mutante mit inhibierter GAP-Aktivität (73); Austausch der Aminosäure 1695 von Arginin durch Methionin

Der Sequenz der verwendeten Konstrukte RhoA, RhoB und RhoC wurde N-terminal eine VSV-Sequenz vorangestellt. Diese kodiert für 11 Aminosäuren des vesicular stomatis virus glycoprotein, und wird vom monoklonalen Antikörper P₅D₄ erkannt (74).

2.3. Bakterienstämme

Verwendete *Shigellen*-Stämme:

- *Shigella flexneri* M90T: Wildtyp vom Serotyp 5 (75).
- *Shigella flexneri* BS176: Apathogene Mutante von M90T ohne Virulenzplasmid (76).

- *Shigella flexneri* SC301: Pathogener Stamm, der das Plasmid IL-22 enthält. Das Plasmid trägt ein Gen zur Bildung von afimbriären Adhäsinen 1, wodurch er Adhärenz und somit eine höhere Pathogenität erlangt (77, 40). Der Selektionsmarker für pIL-22 ist Ampicillin.
- *Shigella flexneri* SC300: Apathogener Stamm, der dem Stamm SC301 ohne Virulenzplasmid entspricht (40).
- *Shigella flexneri* SC560: Apathogene Mutante von M90T, die IcsA-negativ und dadurch nicht zu intrazellulärer Bewegung fähig ist (33).

2.4. Zellkultur

Verwendete Zelllinie: HeLa-Zellen

HeLa-Zellen sind Zellen eines stark wachsenden Zervixkarzinoms, die seit 1951 in Gewebekultur gezüchtet werden. Die Patientin Henrietta Lacks, von deren Zervixkarzinom diese Zellen abstammen, gab dieser Zelllinie ihren Namen (78).

Die Einsaat der HeLa-Zellen erfolgte in einer Konzentration von 2×10^5 /ml in 100 mm Gewebekulturschalen (GREINER) in 15 ml MEM (minimal essential medium with glutamine; GIBCO) mit 10% FKS (fötales Kälberserum; GIBCO). Nach 2 Tagen Bebrütung der Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ waren sie konfluent gewachsen. Nach Ablösung der Zellen durch 3,5 ml Trypsin (❶) wurden die Zellen in 9,5 ml MEM aufgenommen und anschließend 4 Minuten bei 125xg zentrifugiert. Daraufhin wurden der Überstand abgenommen, die Zellen in 2 ml MEM resuspendiert und zum Auszählen der Zellen ein Tropfen der Suspension auf eine Zählkammer aufgetragen. Nach Auszählung und Ermittlung der HeLa-Zell-Konzentration in der Suspension konnten nun die Volumina berechnet werden, die zur korrekten Konzentrationseinstellung für die Weiterzucht oder für geplante Experimente benötigt wurden.

- ❶ Trypsin (50 ml): 5 ml Trypsin-Lösung 2,5% (GIBCO)
 5 ml EDTA-Lösung (❷)
 40 ml H₂O

② EDTA-Lösung für Trypsin:	6,85 mM	EDTA
	1,37 M	NaCl
	26,8 mM	KCl
	81 mM	Na ₂ HPO ₄ , 12xH ₂ O
	147 mM	KH ₂ PO ₄

2.5. Transfektion von HeLa-Zellen

Einen Tag vor der Transfektion erfolgte die Einsaat der HeLa-Zellen mit einer Konzentration von 1×10^5 /ml in eine 6-Loch-Platte (FALCON), die pro Vertiefung 2 ml Medium (MEM + 10% FKS) sowie ein steriles 22x22 mm Deckgläschen enthielt. Nach 16-20 stündiger Bebrütung der Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ wurde 2-4 Stunden vor der Transfektion das Medium gewechselt. Das Volumen des Transfektionsansatzes betrug pro Vertiefung 250 µl. Das Pipettierschema lautete wie folgt:

- 9 µg DNA/Vertiefung
- 12,5 µl 2,5 M CaCl₂ /Vertiefung (Endkonzentration: 125 mM)
- auf 125 µl/Vertiefung mit Aqua bidest. auffüllen
- unter kräftigem Schütteln (damit kleinste Präzipitate gebildet werden) tropfenweise doppelt konzentriertes BBS (③) 125 µl/Vertiefung zugeben (Endkonzentration: 1x BBS)

③ - Doppelt konzentriertes BBS (pH 6,95):

50 mM	N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethanesulfonic acid (BES)
280 mM	NaCl
1,5 mM	Na ₂ HPO ₄

Dieser Ansatz wurde 15-20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend tropfenweise auf die HeLa-Zellen pipettiert (250 µl/Vertiefung). Während der nun folgenden 20-24 Stunden Bebrütung der Zellen bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte die Aufnahme der Präzipitate. Nach 3x Waschen mit MEM folgte die Zugabe neuen Mediums auf die Zellen. Nach weiteren 15-20 Stunden war die Expression der Proteine optimal und damit dies die günstigste Zeit für darauffolgende Experimente.

2.6. Infektion

Einer Infektion von HeLa-Zellen ging meist eine Transfektion voraus (siehe 2.5.). War dies nicht der Fall, so wurden die HeLa-Zellen 20-24 Stunden vor der Infektion mit einer Konzentration von 3×10^5 /ml in eine 6-Loch-Platte mit 2 ml Medium/Vertiefung und einem Deckgläschen/Vertiefung eingesät. Unmittelbar vor der Infektion wurden die Zellen 3x mit MEM sowie 1x mit PBS (④) gewaschen.

Die *Shigella flexneri*-Stämme wurden in TSB (tryptic soy broth; FLUKA) kultiviert. Bei den Stämmen SC301 bzw. SC300 wurde dem TSB Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml als Selektionsmarker für pIL-22 und beim Stamm SC301 zusätzlich noch Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zur Sicherung des Virulenzplasmides zugesetzt. Nach Inokulation am Abend vor der Infektion und anschließender 15-20 stündiger Anzucht im Schüttelinkubator bei 37°C und 200 Runden pro Minute (rpm) konnte eine 1:100 Verdünnung hergestellt werden, welche sich nach weiteren 3 Stunden Inkubation im Schüttelinkubator in einer exponentiellen Phase befand. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei 600 nm. Eine Extinktion von 1 entsprach einer Konzentration von ca. 4×10^8 Bakterien/ml. Die je nach Experiment benötigten Volumina dieser Verdünnung wurden 10 Minuten bei 5100xg und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde im entsprechenden Volumen MEM (4°C) aufgenommen und bis zur Infektion auf Eis gelagert.

2.6.1 Infektion mit *Shigella flexneri* SC301 oder SC300

2 ml des jeweiligen *Shigella flexneri*-Stammes (Konzentration 6×10^7 /ml MEM) wurden auf die Zellen gegeben und anschließend 45 Minuten bei RT inkubiert, um den Bakterien die Anheftung an die Zellen zu ermöglichen. Die Infektion der Zellen erfolgte in 20 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C. Danach wurden die Zellen 4x mit PBS gewaschen und anschließend mit Paraformaldehyd (⑤) fixiert.

2.6.2 Infektion mit *Shigella flexneri* M90T, BS176 oder SC560

Die Infektion erfolgte mit einer Bakterienkonzentration von 3×10^7 /ml bei Infektion mit M90T bzw. BS176 und 4×10^7 /ml bei Infektion mit SC560. Nach Zugabe der 4°C kalten Bakteriensuspension auf die Zellen wurden die Bakterien aufgrund der fehlenden Adhärenz 10 Minuten bei 1500xg und RT auf die Zellen zentrifugiert und anschließend für die Infektion

30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Bei einer Infektion mit den *Shigella flexneri*-Stämmen M90T oder BS176, z.B. für Zytoskelettdarstellungen, folgte anschließend 4x Waschen mit PBS und die Fixierung mit Paraformaldehyd. Bei einer Infektion mit dem Stamm SC560 für die quantitativen Invasionsexperimente wurde nach der Inkubation im Wasserbad das Medium abgezogen, 3x mit MEM gewaschen und frisches Medium mit 50 µg/ml Gentamicin zugesetzt. Danach wurden die Zellen weitere 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert, anschließend 6x mit MEM gewaschen und daraufhin mit Paraformaldehyd fixiert. Gentamicin wird von den HeLa-Zellen nicht aufgenommen, so dass nur intrazelluläre *Shigellen* überleben.

- ④ PBS: Es wurde immer 1x PBS verwendet. Dazu wurde eine 1:10 Verdünnung von 10x PBS hergestellt.

10x PBS:	18 mM	NaH ₂ PO ₄
	126 mM	Na ₂ HPO ₄ , 2x H ₂ O
	1,5 M	NaCl

- ⑤ Paraformaldehyd: 3,7 g Paraformaldehyd wurden in 20 ml H₂O gegeben und auf 50-60°C erwärmt. Nun wurde tropfenweise 10 M NaOH zugegeben, bis sich Paraformaldehyd vollständig gelöst hatte. Nach Abkühlen auf RT wurden 10 ml 10x PBS zugegeben. Der Ansatz wurde anschließend mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.7. Färbungen

2.7.1 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde für Zytoskelettdarstellungen und die quantitativen Invasionsexperimente eingesetzt.

- Verwendete Primärantikörper und Verdünnungen in PBS, (Hersteller):
 - anti-HA-tag-Kaninchen (polyklonaler Antikörper), 1:100, (HISS, Freiburg)
 - anti-HA-tag-Maus (monoklonaler Antikörper), 1:500, (HISS, Freiburg)

- anti-LPS-*Shigella flexneri*-Kaninchen (polyklonaler Antikörper), 1:250,
(freundlicherweise überlassen von Philippe Sansonetti, Institut Pasteur, Paris)
- anti-VSV-tag-Maus = P₅D₄ (monoklonaler Antikörper), 1:200, (Überstand von
Hybridom-Kultur, die von Thomas Kreis, Heidelberg, zur Verfügung gestellt wurde
(74))
- Verwendete Sekundärantikörper und Fluoreszenzfarbstoffe: siehe Tab. 2

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper und Fluoreszenzfarbstoffe. * Phalloidin wurde erst luftgetrocknet und anschließend in 1x PBS oder im Sekundärantikörperansatz verdünnt.

	Anregung	Emission	Verdünnung in 1xPBS	Hersteller
anti-Maus-Fluoreszein (FITC)	492 nm	520 nm	1:100	DIANOVA
anti-Maus-Texas Red (TR)	596 nm	623 nm	1:100	DIANOVA
anti-Maus-Cy 3	553 nm	575 nm	1:200	DIANOVA
anti-Kaninchen-Fluoreszein	492 nm	520 nm	1:100	DIANOVA
anti-Kaninchen-Texas Red	596 nm	623 nm	1:100	DIANOVA
anti-Kaninchen-Cy 3	553 nm	575 nm	1:200	DIANOVA
* BODIPY FL Phalloidin	505 nm	512 nm	1:10	MOLECULAR PROBES

Die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen wurden 20 Minuten mit 3,7% Paraformaldehyd bei RT fixiert und anschließend zur Neutralisation der Aldehydgruppen mindestens 5 Minuten in 0,1 M Glyzin bei RT inkubiert. Daraufhin folgte die 5 minütige Permeabilisierung mit 0,1% Triton-X-100 in PBS. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Zellen jeweils 3x mit PBS gewaschen. Nach Zugabe der Primärantikörper gegen das HA- bzw. VSV-tag (40µl/Deckgläschen) erfolgte die 20-minütige Inkubation in einer feuchten Kammer bei RT. Zur Darstellung von *Shigellen*, z.B. für die quantitativen Invasionsexperimente, wurde der anti-LPS-*Shigella flexneri*-Kaninchen Antikörper verwendet. Die Zellen wurden dann erneut 3x mit PBS gewaschen. Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden nun die Zellen mit den Sekundärantikörpern (40µl/Deckgläschen) wiederum in einer feuchten Kammer für mindestens 20 Minuten bei RT inkubiert. Nach dem zweiten Färbeschritt wurden die Deckgläschen 3x mit PBS gewaschen und möglichst blasenfrei auf einem Objektträger in Mowiol (6) eingebettet. Nach 10- minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Präparate bei 4°C aufbewahrt.

⑥ Mowiol: 2,4 g Mowiol 4-88 (HOECHST) wurden mit 6 g Glyzerol und 6 ml H₂O gemischt und für mindestens 2 Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurden 12 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5, zugegeben und die Lösung erst 10 Minuten auf 50°C erwärmt, dann 15 Minuten bei 5000xg zentrifugiert und schließlich aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei –20°C.

2.7.2 GIEMSA-Färbung

Wir führten im Vorfeld der quantitativen Invasionsassays Experimente zur Optimierung der Infektionseffizienz mit dem Stamm SC560 durch. Dabei verwendeten wir zur Darstellung von intrazellulären *Shigellen* die weniger zeitaufwendige GIEMSA-Färbung.

Die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen wurden dabei 1 Minute mit 100% Ethanol fixiert. Nach Absaugen des Ethanols wurden die Zellen getrocknet, 2x mit PBS gewaschen und 20 Minuten lang mit GIEMSA-Lösung gefärbt.

2.8. Mikroskopieren

Zum Betrachten der Präparate und zum Anfertigen der Fotos wurden das Inverse Mikroskop Axiovert 135, ZEISS, verwendet.

Für die Fotodokumentation wurde der Kodak Ektachrome, Elite II, ASA 400, Farbdiafilm, verwendet.

2.9. DNA-Transformation, -Gewinnung, -Reinigung und -Präzipitation

2.9.1 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

Um *E.coli*-Zellen kompetent, das heißt sie aufnahmebereit für freie DNA zu machen, wurde das nachfolgend beschriebene Verfahren verwendet.

E.coli-DH_{5α}-Zellen wurden in Luria Bertani broth (LB; FLUKA) inokuliert und für 16-20 Stunden im Schüttelinkubator bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Dann wurde eine 1/100 Verdünnung hergestellt und diese weitere 3 Stunden im Schüttelinkubator bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Nun wurden die Bakterien 10 Minuten bei 2600xg und 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml 100 mM CaCl₂ aufgenommen. Nach einer Inkubation von 20 Minuten auf Eis wurde der Ansatz 10 Minuten bei 2600xg und 4°C

zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde nun in 2 ml 125 mM CaCl_2 suspendiert. Dazu wurden dann 500 μl Glycerol gegeben und die Bakterien anschließend bei -80°C gelagert.

2.9.2 DNA-Transformation in *E.coli*-DH₅ α -Zellen

Die Transformanden wurden über eine Plasmid-kodierte Ampicillin-Resistenz selektiert. Dazu wurden die bei -80°C gelagerten, kompetenten *E.coli*-Zellen (siehe 2.9.1) auf Eis aufgetaut. Dann wurde zu 100 μl Bakterienlösung ca. 2 μg DNA zugegeben und für mindestens 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend kam der Ansatz für exakt 2 Minuten in ein 42°C warmes Wasserbad. Nun wurden 900 μl LB zugegeben. Nach einer Stunde bei 37°C im Wärmeblock wurde der Ansatz 2 Minuten bei 15800xg und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 μl LB aufgenommen, die Bakteriensuspension auf eine LB-Ampicillin-Platte (7) ausgespatelt und für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 0,9% CO_2 inkubiert. Da sich auf dem Plasmid, das die DNA enthielt, z.B. das Gen für Myr5, auch eine Sequenz befand, die für eine Ampicillin-Resistenz kodierte, selektierte die LB-Ampicillin-Platte zugunsten derjenigen Bakterien, die dieses Plasmid und somit die DNA aufgenommen hatten. Von der Platte wurden dann Einzelkolonien abgenommen und jeweils in 10 ml LB mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin überimpft. Nach weiteren 24 Stunden Bebrütung im Schüttelinkubator bei 37°C und 200 rpm wurden zu 900 μl dieser Bakteriensuspension 300 μl Glycerol gegeben und die Bakterien bei -80°C gelagert.

- 7 LB-Ampicillin-Platte: Einem Liter H_2O wurden 20 g LB und 13 g Agar zugegeben und anschließend autoklaviert. War der Ansatz auf ca. 50°C abgekühlt, wurden ihm 2 ml Ampicillin (50 mg/ml; SIGMA) zugesetzt und schließlich die Platten gegossen.

2.9.3 DNA-Gewinnung

Zur DNA-Gewinnung wurden die Bakterien in ca. 400 ml LB inokuliert und ca. 20 Stunden im Schüttelinkubator bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Nach Abzentrifugation der Bakterien bei 3200xg wurde die DNA unter Verwendung eines kommerziellen Plasmid-Präparationssystems (QIAGEN - maxi bzw. midi prep) aus den Bakterien gewonnen. Dabei wurde nach der Lyse der Bakterien die Plasmid-DNA mittels Salzfällung von der chromosomalen DNA getrennt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch eine

Anionenaustauschchromatographie. Dabei wurde im ersten Schritt bei geringer Salzkonzentration die Plasmid-DNA an die Säule gebunden, während Proteine und Bakterienreste die Säule passierten. Nach zwei Waschschritten wurde dann die Plasmid-DNA bei hoher Salzkonzentration eluiert. Nach der Präzipitation der DNA mit Isopropanol und Entsalzung mit 70% Ethanol wurde die DNA in Aqua bidest. aufgenommen. Anschließend wurde die DNA-Konzentration am Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.9.4 DNA-Reinigung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Dieses Verfahren dient zur Trennung von Proteinen und DNA und beruht auf den unterschiedlichen hydrophilen bzw. hydrophoben Eigenschaften von Proteinen und DNA.

Die in Wasser gelöste DNA wurde, um Verluste beim Pipettieren von sehr kleinen Volumina zu vermeiden, mit 1x TE (⑧) auf 300 µl aufgefüllt. Diesem Ansatz wurden 300 µl Phenol (4°C) zugegeben und dann 2 Minuten gemixt. Dabei lösten sich die Proteine in der hydrophoben Phase des Phenols. Die DNA hingegen verblieb in der hydrophilen Phase. Zur Trennung der beiden Phasen erfolgte eine Zentrifugation von 15 Minuten bei 15800xg und 4°C. Die obere, klare, wässrige Phase, in der die DNA gelöst war, wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert. Zum abgenommenen Überstand wurde im Verhältnis 1:1 ein Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1; 4°C, FLUKA) gegeben und dann wieder 2 Minuten gemixt. Dabei lösten sich noch vorhandene Proteine und das Phenol aus dem ersten Schritt in der hydrophoben Phase, wohingegen die DNA wiederum in der wässrigen Phase verblieb. Daraufhin wurde wieder 15 Minuten bei 15800xg und 4°C zentrifugiert und der hydrophile Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert. Dazu wurde dann Chloroform, RT, im Verhältnis 1:1 gegeben und erneut 2 Minuten gemixt. Da sich das in der hydrophilen Phase verbliebene Phenol im hydrophoben Chloroform löste, diente dieser Schritt auch der Reinigung der hydrophilen Phase vom Phenol. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 15800xg und RT konnte der Überstand, mit der darin gelösten DNA, in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert werden. Anschließend folgte meist eine Ethanolpräzipitation (siehe 2.9.5).

⑧ TE-Puffer (pH 8,0): 100 mM Tris-HCl
 10 mM EDTA

2.9.5 Ethanolpräzipitation

Die Ethanolpräzipitation diente dem Ausfällen der DNA. Ihr ging immer eine Phenol-Chloroform-Extraktion voraus.

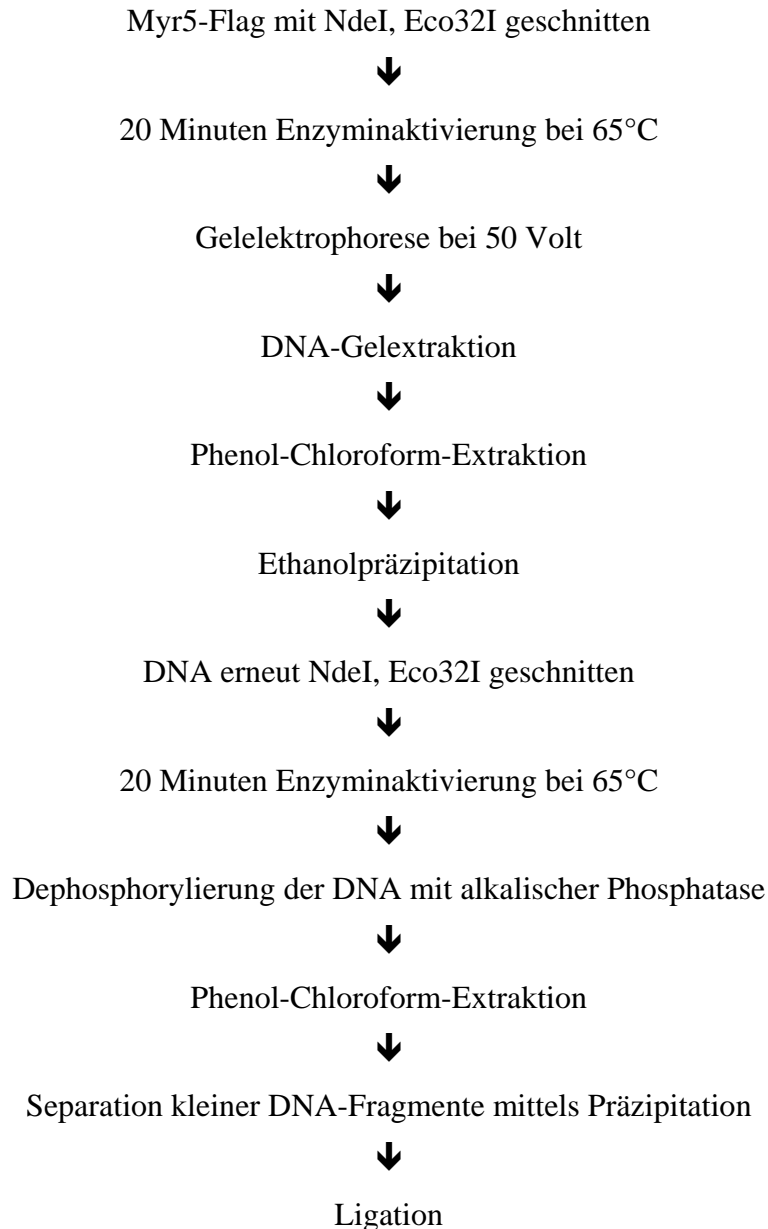
Beim ersten Schritt der Präzipitation wurde dem zuletzt abgenommenen Überstand der Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.9.4) 1/10 von dessen Ausgangsvolumen an 3 M Natriumazetat, pH 5,2, zugesetzt. Dieser Lösung wurde nun das Zweifache ihres Volumens an 100% Ethanol (-20°C) zugegeben. Bei einem Ausgangsvolumen des Überstandes aus 2.9.4. von z.B. 300 μl wurde diesem somit 30 μl Natriumazetat sowie 660 μl 100% Ethanol (-20°C) zugesetzt. Nach vorsichtigem Wenden dieses Ansatzes war bei größeren Mengen an DNA oft schon mit bloßem Auge ein DNA-Präzipitat erkennbar. Der Ansatz wurde bei -20°C über Nacht inkubiert, tags darauf 15 Minuten bei 15800xg und -2°C zentrifugiert und anschließend der Ethanol-Überstand abgenommen. Dem DNA-Pellet wurde dann zum Waschen 1 ml 70% Ethanol (-20°C) zugegeben. Es folgte wiederum eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 15800xg und -2°C . Der Abnahme des Überstandes und der Zugabe von 200 μl 100% Ethanol (-20°C) zur DNA schloss sich eine 10 minütige Zentrifugation für 10 Minuten bei 15800xg und -2°C an. Der Überstand wurde erneut abpipettiert und das DNA-Pellet getrocknet, bis es glasig aussah. Die Zugabe von 100% Ethanol war sinnvoll, da dieses wesentlich schneller vollständig an der Luft verdampfte als 70% Ethanol und somit die Zeit zum Trocknen der DNA erheblich verkürzte. Das DNA-Pellet wurde anschließend in Aqua bidest. aufgenommen, wobei das Volumen an zugesetztem Wasser von der ungefähren DNA-Menge abhing. Die Konzentration an DNA wurde dann am Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.10. Herstellung des Myr5-VSV-tag-Konstruktes

Um Myr5 und das GAP-negative Myr5-250 parallel darstellen zu können, musste eines der beiden Konstrukte mit einem neuen tag versehen werden. Dazu wurde von Prof. Martin Bähler, Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik Münster, das mit einem Flag-tag versehene Myr5 im Vektor pUHD 310/311 (Myr5-Flag) bezogen. Aus diesem Konstrukt Myr5-Flag wurde die für das Flag-tag kodierende Sequenz über die Schnittstellen der Enzyme NdeI (sticky end; MBI/FERMENTAS) und Eco32I (blunt end; MBI/FERMENTAS) ausgeschnitten und anschließend eine kurze Doppelstrang-DNA, die für ein VSV-tag kodierte

und durch Hybridisierung von zwei Oligonukleotiden (EUROGENTEC, Sequenz siehe Abb. 17) hergestellt wurde, über die gleichen Schnittstellen wieder einkloniert.

2.10.1 Schema der Vorgehensweise



2.10.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Folgende Überlegungen und Berechnungen gingen dem Restriktionsansatz voraus:

- a) 1 Einheit (unit) einer Restriktionsendonuklease schneidet 1 µg einer 3,5 kb langen DNA in einer Stunde zu 99%. Dies entspricht einer 1-fachen Restriktion. Geschnitten wurden 20 µg einer 9,2 kb langen DNA (Myr5-Flag in pUHD 310/311) in 2 Stunden mit einer 12-fachen Restriktion. Somit wurden 60 Einheiten beider Enzyme benötigt.

- b) Die Restriktionsenzyme wurden mindestens 1/20 verdünnt, da sich bei Glycerolkonzentration von > 5% die Aktivität der Enzyme erfahrungsgemäß verringert.
- c) Buffer R (MBI/FERMENTAS), den beide Enzyme zum Schneiden benötigten, musste im Ansatz 1-fach vorliegen.
- d) BSA (bovines serum albumin; MBI/FERMENTAS), das die Effizienz der Enzyme steigerte, musste im Ansatz eine Konzentration von 0,1 mg/ml aufweisen.
- e) Als Kontrolle wurden je 2 µg der DNA nur mit NdeI bzw. Eco32I geschnitten. Anhand der Kontrollen konnte bei der anschließenden Elektrophorese beurteilt werden, ob beide Enzyme das Plasmid geschnitten hatten.

Somit ergab sich folgender Ansatz: siehe Tab. 3

Tab. 3: Pipettierschema des 1. Restriktionsansatzes.

Gesamtvolumen	DNA 1,27 µg/µl	Buffer R 10-fach	BSA 2 mg/ml	NdeI 10 unit/µl	Eco32I 10 unit/µl	Aqua
300 µl	15,8 µl	30 µl	15 µl	6 µl	6 µl	227,2 µl
30 µl	1,6 µl	3 µl	1,5 µl	0,6 µl	/	23,3 µl
30 µl	1,6 µl	3 µl	1,5 µl	/	0,6 µl	23,3 µl

Zum Schneiden wurden die Proben 2 Stunden lang im Wärmeblock bei 37°C inkubiert und anschließend die Enzyme durch 20 Minuten im Wärmeblock bei 65°C inaktiviert.

2.10.3 Gelelektrophorese

Das ausgeschnittene Fragment (Flag-tag) wurde nun mittels Gelelektrophorese vom Plasmid (pUHD+Myr5) getrennt. Das Verfahren beruht auf den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten von verschieden großen DNA-Fragmenten im elektrischen Gleichspannungsfeld. Dazu wurde ein 1x TAE (⑨), 1% Agarosegel benutzt. Vor dem Auftragen wurde den Proben TAE, Endkonzentration 1x, und Loading-Buffer (⑩), in Probe 1:6 verdünnt, zugesetzt (siehe Tab. 4).

Tab. 4: Ansätze für die Gelelektrophorese.

Probe	Gesamtvolumen	Restrik.-ansatz	1 kb Leiter	50x TAE	Loading-B.	Aqua
NdeI, Eco32I	400 µl	300 µl	/	8 µl	65 µl	27 µl
NdeI	50 µl	30 µl	/	1 µl	8 µl	11 µl
Eco32I	50 µl	30 µl	/	1 µl	8 µl	11 µl
1 kb Leiter	50 µl	/	1,5 µl	1 µl	8 µl	39,5 µl

Die Proben wurden, nach einer Inkubation von 5 Minuten / 70°C, bei 50 Volt ca. 90 Minuten im Gel laufen gelassen und die interessierende Bande unter einer UV-Lampe ausgeschnitten.

⑨ 50x TAE: 242 g Tris
 57,1 ml 100% CH₃COOH
 100 ml 0,5 M EDTA
 ad 1000 ml H₂O

⑩ Loading-Buffer: 0,25% Xylin-Cyanol
 0,25% Bromphenolblau
 30% Glyzerol

2.10.4 Gelextraktion, Dephosphorylierung, Präzipitation kleiner DNA-Fragmente

Die Gelextraktion erfolgte nach dem Protokoll "QIAquick Gel Extraction Kit" von QIAGEN. Nachdem das Gel aufgelöst worden war, wurde bei diesem Verfahren die DNA mit Hilfe einer Silica-Membran vom Gel getrennt. Dabei wurde die DNA im ersten Schritt bei einer hohen Salzkonzentration und bei einem geringen pH-Wert (Zugabe von Natriumazetat) an die Membran gebunden, das Gel jedoch nicht. Nun wurde die DNA gewaschen und anschließend bei geringer Salzkonzentration und einem höheren pH-Wert mit 265 µl Aqua bidest. eluiert. Dann erfolgte am Spektralphotometer bei 260 nm die Konzentrationsbestimmung der DNA. Diese ergab eine Konzentration von 0,026 µg/µl. Bei einem Volumen von 265 µl waren dies also 6,89 µg DNA.

Dem schloss sich eine Phenol-Chloroform-Extraktion sowie eine Ethanolpräzipitation (siehe

2.9.4 bzw. 2.9.5) an, wobei die ca. 4 µg DNA in 20 µl Aqua bidest. aufgenommen wurden. Hiernach wurde die DNA nochmals mit NdeI und Eco32I geschnitten. Dies hatte den Sinn, die Anzahl ungeschnittener sowie nur einfach geschnittener Plasmide möglichst gering werden zu lassen. Zum Schneiden wurden von den 20 µl DNA 11 µl (ca. 2,2 µg) eingesetzt und 2 Stunden mit 14-facher Restriktion geschnitten (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Pipettierschema des 2. Restriktionsansatzes.

Gesamtvolumen	DNA 0,2 µg/µl	Buffer R 10-fach	BSA 2 mg/ml	NdeI 10 unit/µl	Eco32I 10 unit/µl	Aqua
100 µl	11 µl	10 µl	5 µl	0,8 µl	0,8 µl	72,4 µl

Nach der Enzyminaktivierung folgte eine Dephosphorylierung der DNA mit alkalischer Phosphatase. Dabei wurde nach dem “Protocol for DNA dephosphorylation using calf intestine alkaline phosphatase (CIAP)” (MBI/FERMENTAS) vorgegangen. Hierbei wurden mittels einer Phosphomonoesterase von den DNA-Enden freie Phosphate abgespalten. Da eine Ligation von Doppelstrang-DNA nur möglich ist, wenn mindestens einer der zu ligierenden Stränge ein Phosphat besitzt, konnte anschließend nur eine Ligation zwischen den hybridisierten Oligonukleotiden (siehe Abb. 17), die an ihrem 5'-Ende jeweils phosphoryliert waren, und der DNA erfolgen. Eine Religation von nur einfach geschnittenen Plasmiden wurde dadurch ausgeschlossen. Der Dephosphorylierung folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion.

Eine Ligation zwischen den hybridisierten Oligonukleotiden und den beim 2. Schneiden ausgeschnittenen Flag-tag-Fragmenten wurde verhindert, indem diese kleinen Fragmente nach dem Protokoll des DSTM Primer Remover® (MOBITEC) aus dem Ansatz entfernt wurden. Das Verfahren beruht auf der unterschiedlichen Präzipitation kleiner (bis ca. 100 bp) und großer DNA-Fragmente. Die verbliebene DNA wurde in 12 µl Aqua bidest. aufgenommen (Konzentration: 0,125 µg/µl). Eine genaue Konzentrationsbestimmung der DNA wurde aufgrund der geringen DNA-Menge nun nicht mehr durchgeführt.

2.10.5 Oligonukleotidhybridisierung

Bei der Hybridisierung bildeten zwei komplementäre einsträngige Oligonukleotide ein doppelsträngiges DNA-Fragment (VSV-tag). Dabei wurden zu 30 µl 40 mM Tris-HCl, pH 7,5, je 5 µl Oligonukleotid 1 (80 µM, siehe Abb. 17) sowie Oligonukleotid 2 (80 µM, siehe Abb. 17) zugegeben, so dass beide Oligonukleotide im Ansatz 10 µM vorlagen. Dieser Ansatz wurde 10 Minuten bei 90°C inkubiert und dann erst bei RT auf exakt 45°C und anschließend in Eiswasser auf 0°C abgekühlt.

2.10.6 Ligation

Die Ligation erfolgte nach dem Protokoll “Ligation with T4 DNA ligase (with PEG) / 1. DNA insert ligation into plasmid vektor“ (MBI/FERMENTAS).

Pro Ligation wurden 2 µl DNA eingesetzt. Dies entsprach etwa 40 fmol DNA. Da diese DNA-Menge nur eine Schätzung war, wurden verschiedene Verhältnisse zwischen DNA (Vektor) und Oligohybrid gewählt, nämlich 1:20, 1:5, 1:1, 2:1 und 8:1. Somit waren die in Tab. 6 dargestellten Ansätze nötig:

Tab. 6: Pipettierschema der Ligationsansätze.

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4	Ansatz 5	Ansatz 6	Ansatz 7	Ansatz 8
Verhältnis V/O	1 : 20	1 : 5	1 : 1	2 : 1	1 : 8	/	/	/
Vektor	2 µl 41,6 fmol	2 µl 41,6 fmol	2 µl 41,6 fmol	2 µl 41,6 fmol	2 µl 41,6 fmol	2 µl 41,6 fmol	/	/
Oligohybrid	2 µl 832 fmol	2 µl 208 fmol	2 µl 41,6 fmol	2 µl 20,8 fmol	2 µl 5,23 fmol	/	2 µl 41,6 fmol	/
Stammlösung	16 µl	16 µl	16 µl	16 µl	16 µl	16 µl	16 µl	16 µl
Aqua	/	/	/	/	/	2 µl	2 µl	4 µl

Die Ansätze 6, 7 und 8 dienten als Negativkontrollen, wobei Ansatz 6 ein Maß für die Anzahl an ungeschnittenen Plasmiden lieferte.

Da das Gesamtvolumen pro Ligationsansatz laut Protokoll 20 µl betragen sollte, blieb abzüglich der 2 µl Vektor und 2 µl Oligohybrid pro Ligationsansatz ein Volumen von 16 µl für die übrigen Zusätze. Da diese für jeden Ansatz identisch waren, wurden sie zu einer

“Stammlösung“ zusammenpipettiert. Diese wurde nach Protokoll hergestellt, wobei 4 Einheiten T4 DNA Ligase pro Ligation verwendet wurden, weil die Eco32I-Schnittstelle “blunt end“ ligiert werden musste.

Die benötigten Verdünnungen des Oligohybrides (10 µM) in Aqua bidest lauteten wie folgt: siehe: Tab. 7:

Tab. 7: Verwendete Oligohybridverdünnungen für die Ligationsansätze.

	für Ansatz 1	für Ansatz 2	für Ansatz 3+7	für Ansatz 4	für Ansatz 5
Verdünnung	1 : 24	1 : 96	1 : 480	1 : 960	1 : 3840

Die Proben wurden nun 1 Stunde bei 22°C inkubiert. Dann erfolgte die Transformation. Die dazu benutzten *E.coli*-DH_{5α}-Zellen wurde anschließend auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen und für 20 Stunden bei 37°C inkubiert. Vom Ligationsansatz 2 (V/O=1:5), bei welchem die meisten Kolonien gewachsen waren, wurden 4 Kolonien abgenommen, auf LB-Ampicillin-Platten fraktioniert ausgestrichen und für 20-24 Stunden bei 37°C inkubiert. Von jeder der 4 Platten wurde dann eine Einzelkolonie in LB inokuliert und tags darauf eine DNA-Präparation (midi prep; QIAGEN) durchgeführt. Mit den gewonnenen DNA`s wurden anschließend HeLa-Zellen transfiziert und mittels einer Immunfluoreszenzfärbung (Primärantikörper: anti-VSV-tag-Maus, Sekundärantikörper: anti-Maus-TR) die Expression des neuen Konstruktes geprüft.

3. Ergebnisse

3.1. Änderung der Zellmorphologie durch Überexpression von Myr5

Für die Untersuchungen wurde Myr5 in den Vektor pUHD kloniert und mit einem Hämagglutinin-Epitop (HA-tag) versehen. Im Rahmen der ersten Untersuchungen wurden HeLa-Zellen mit Myr5 transfiziert. Danach wurde Myr5 mit einem Primärantikörper, der gegen das HA-tag von Myr5 gerichtet war, markiert und über einen Texas-Red-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt. Die Darstellung von Aktin erfolgte mittels BODIPY FL Phalloidin.

Die anschließend beobachteten Veränderungen der Zellmorphologie der HeLa-Zellen waren vom Expressionsniveau von Myr5 abhängig. Während die Zellmorphologie der mit Myr5 schwach und mittelstark transfizierten Zellen denen der nicht transfizierten Zellen glich, konnten bei den stark transfizierten Zellen deutliche Veränderungen der Zellmorphologie festgestellt werden. Zum einen konnte in den stark transfizierten Zellen eine verminderte Bildung von Stressfasern beobachtet werden, zum anderen bildeten diese Zellen filiforme, längliche Zellausläufer, wodurch sie ein Neuron-ähnliches Aussehen zeigten (siehe Abb. 3).

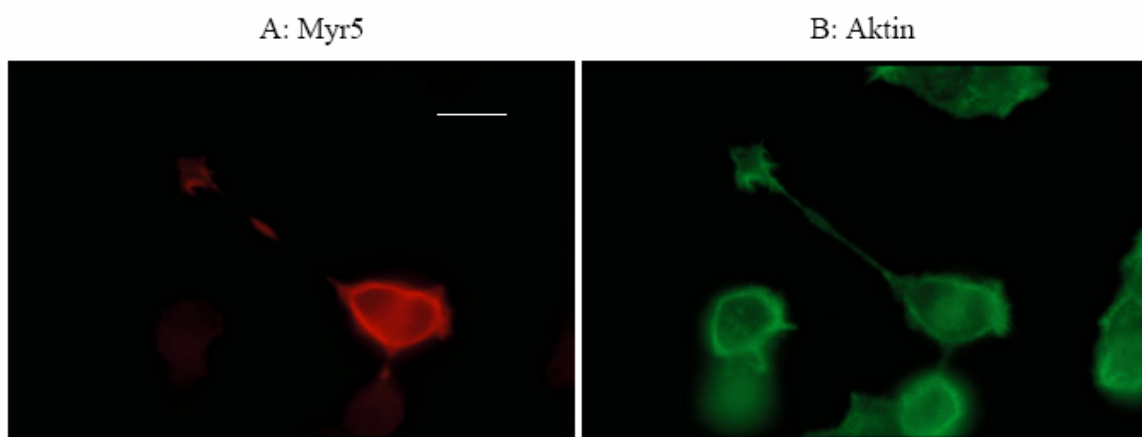


Abb. 3: Neuronen-ähnliches Aussehen einer Myr5 (rot) überexprimierenden HeLa-Zelle in der Doppelfluoreszenzmikroskopie; A: Myr5 wurde mit einem gegen das HA-tag gerichteten Antikörper markiert und über einen Texas-Red-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt, nur transfizierte Zellen sind sichtbar; B: Aktin-Darstellung erfolgte mittels BODIPY FL Phalloidin. Weiße Markierung entspricht 10 μm .

3.2. Rekrutierung von Myr5 in die Invasionszone und Kolokalisation von Myr5 und Aktin an der bakteriellen Eintrittsstelle

Um die Lokalisation von Myr5 bei der Invasion von eukaryoten Zellen durch *Shigella flexneri* zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit Myr5 transfiziert und anschließend mit *Shigellen* infiziert. Mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie konnte nun die Verteilung von Myr5 dargestellt werden. Dabei konnte besonders bei Zellen, die mäßig mit Myr5 transfiziert wurden, bei einer Infektion mit dem invasiven Stamm *Shigella flexneri* SC301 eine erhöhte Konzentration von Myr5 fast ausschließlich in den bakteriellen Eintrittszonen festgestellt werden. In diesen bakteriellen Eintrittszonen wiederum konnte eine bevorzugte Lokalisation von Myr5 in den Spitzen der Protrusionen beobachtet werden, während die tiefere, zellnahe Region der blütenartigen, zellulären Membranstruktur, die sich bei einer Infektion von HeLa-Zellen mit *Shigella flexneri* am Ort der bakteriellen Invasion bildet (1, 10), keine verstärkte Akkumulation von Myr5 zeigte. Wurde nun die Verteilung von Myr5 mit der von filamentärem Aktin (F-Aktin), welches mit Bodipy-FL-Phalloidin gefärbt wurde, verglichen, konnte für beide Proteine eine Kolokalisation im Bereich der bakteriellen Eintrittsstellen beobachtet werden (siehe Abb. 4). Demgegenüber zeigte Myr5 keine Kolokalisation mit F-Aktin der Stressfasern. Wurden parallel zu Myr5 die Bakterien, welche mit LPS-Antikörpern markiert und mit Fluoreszein-gekoppelten Sekundärantikörpern gefärbt wurden, dargestellt, konnten in den Eintrittsstellen *Shigellen* nachgewiesen werden (siehe Abb. 5). Bei einer Infektion der HeLa-Zellen mit dem nichtinvasiven Stamm *Shigella flexneri* SC300 war keine Rekrutierung von Myr5 zu beobachten (siehe Abb. 6). Somit kann angenommen werden, dass die Myr5-Rekrutierung ein Teil des bakteriellen Invasionsprozesses ist.

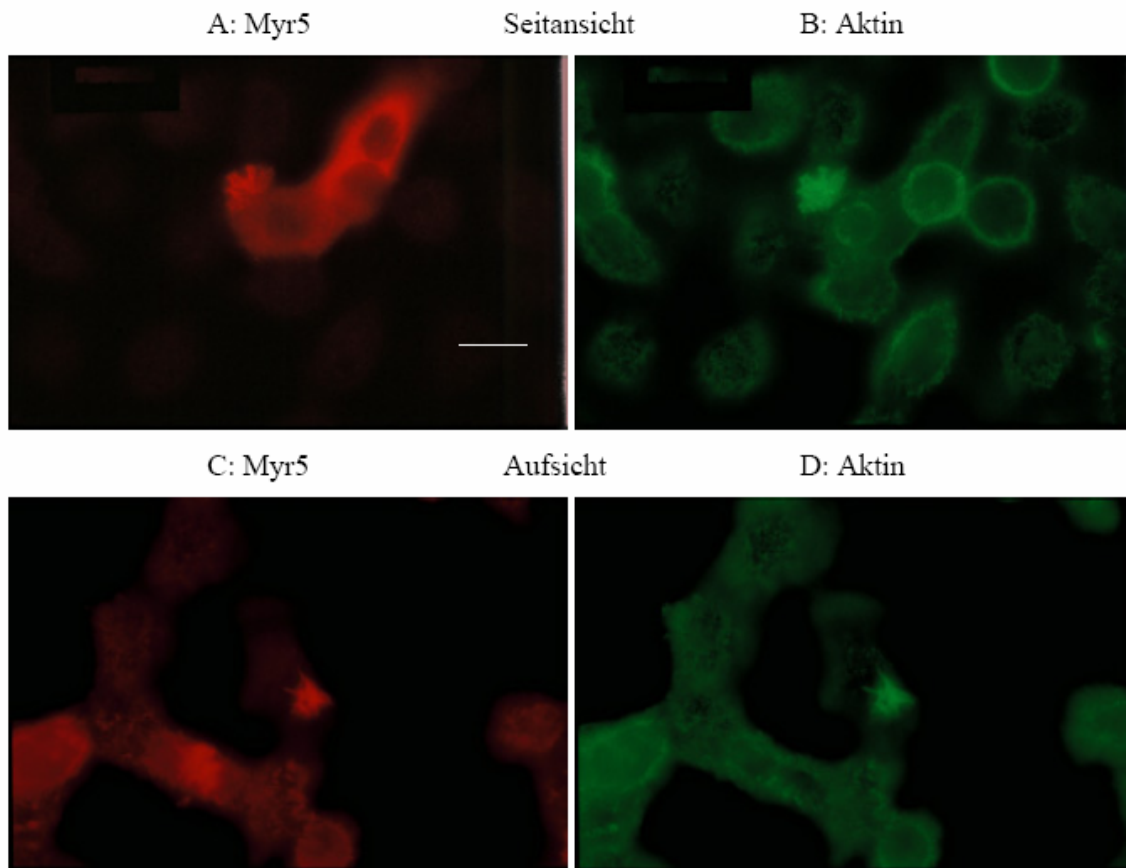


Abb. 4: Kolokalisation von Myr5 (rot) und Aktin (grün) in den Protrusionen der blütenartigen Membranstruktur (A und B: identische Bildausschnitte, Seitansicht; C und D: identische Bildausschnitte, Aufsicht) während der HeLa-Zellinvasion von *Shigella flexneri* SC301; A und C: Myr5 wurde mit einem gegen das HA-tag gerichteten Antikörper markiert und über einen Texas-Red-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt; B und D: Aktin-Darstellung erfolgte mittels BODIPY FL Phalloidin. Weiße Markierung entspricht 10 μm .

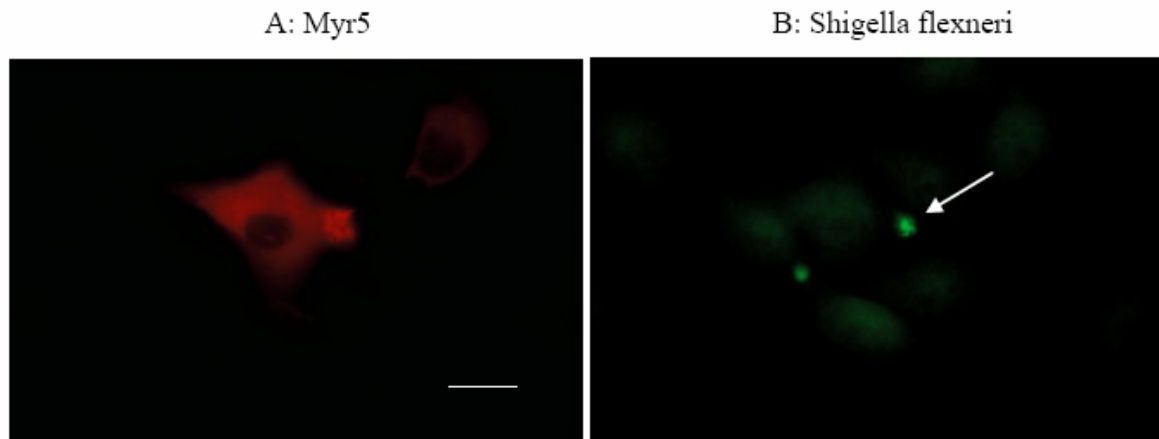


Abb. 5: Die parallele Darstellung von Myr5 (rot) und *Shigella flexneri* M90T (grün) zeigte, dass Myr5 während der bakteriellen Invasion von HeLa-Zellen um *Shigella* (Pfeil) herum akkumuliert; A: Myr5 wurde mit einem gegen das HA-tag gerichteten Antikörper markiert und über einen Texas-Red-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt; B: identischer Bildausschnitt wie A, *Shigella flexneri* M90T wurde mit LPS-Antikörpern markiert und mittels Fluoreszein-gekoppelten Sekundärantikörpern gefärbt. Weiße Markierung entspricht 10 μm .

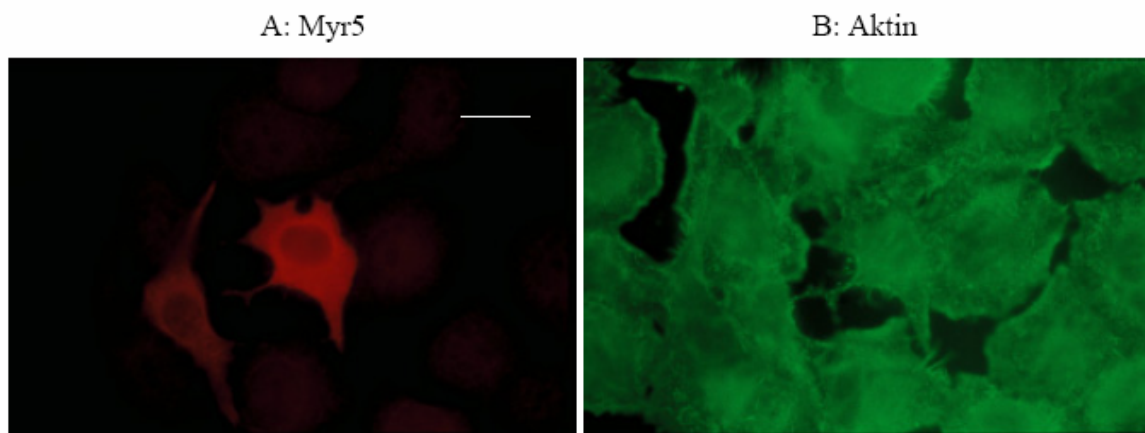


Abb. 6: Negativkontrolle; bei einer Inkubation der HeLa-Zellen mit dem apathogenem Stamm *Shigella flexneri* SC300 konnte keine Rekrutierung von Myr5 (rot) und Aktin (grün) beobachtet werden; A: Myr5 wurde mit einem gegen das HA-tag gerichteten Antikörper markiert und über einen Texas-Red-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt, nur transfizierte Zellen sichtbar; B: identischer Bildausschnitt wie A, Aktin-Darstellung erfolgte mittels BODIPY FL Phalloidin. Weiße Markierung entspricht 10 μm .

3.3. Von der Myosin-Funktion unabhängige Myr5-Rekrutierung in die bakterielle Invasionszone

Myosine können mit filamentärem Aktin interagieren. Besonders umfangreich ist die Interaktion zwischen dem konventionellen Muskelmyosin der Myosinklasse II und F-Aktin während der Kontraktion des Skelettmuskels untersucht worden. Dabei wird F-Aktin gegen Myosin verschoben. Die wesentlichen Schritte dieses sogenannten Querbrückenzyklus seien hier in Kurzform dargestellt. Zu Beginn kann das an ein Aktinfilament gebundene Myosin an einer spezifischen Bindungsstelle im Kopfbereich ein Molekül Adenosintriphosphat (ATP) binden. Die dadurch bewirkte Konformationsänderung in der Myosin-Kopf-Region führt zur Ablösung des Myosins vom Aktin. Nun folgt mittels der ATPase-Aktivität von Myosin die Hydrolyse von ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) unter Abspaltung eines Phosphatrestes ([P]). Die dabei frei werdende Energie wird für eine Änderung des Winkels zwischen Kopf-Region und Schwanz-Region des Myosin-Moleküles genutzt. Nach Dissoziation des [P] bindet Myosin nun an einer anderen Stelle an das Aktinfilament. Durch Dissoziation des ADP von der ATP-Bindungsstelle kehrt das Myosin-Molekül im letzten Schritt des Zyklus in seine Ausgangskonformation zurück und bewirkt dadurch eine Verschiebung des Aktinfilaments gegen Myosin.

Die funktionelle Beziehung zwischen Myosin und Aktin und das einheitliche Rekrutierungsmuster von Myr5 und filamentärem Aktin (siehe 3.2.) bei der Epithelzellinvasion durch *Shigella flexneri* ließen die Vermutung zu, dass die Rekrutierung von Myr5 mittels seiner Myosin-Funktion entlang von filamentärem Aktin erfolgt. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden HeLa-Zellen mit Myr5-Mutanten, deren Myosin-Funktion durch Punktmutationen inhibiert wurde, transfiziert und anschließend die Rekrutierung bei der Infektion mit *Shigellen* geprüft. Wäre die Hypothese der Aktin-abhängigen Rekrutierung von Myr5 richtig, so wäre für die Myr5-Mutanten mit inhibierter Myosin-Funktion bei einer Infektion mit *Shigella flexneri* ein Ausbleiben der Rekrutierung von Myr5 in die bakterielle Invasionszone zu erwarten.

3.3.1 Myr5-Rekrutierung ist unabhängig von der ATP-Bindung

Die Bindung von ATP an Myosin ist der erste Schritt des Querbrückenzyklus und somit wesentlich für die Interaktion von Myosin und Aktin (79). Wird die ATP-Bindung von Myosin inhibiert, so wird auch die Myosin-Funktion inhibiert (80). Eine derartige Inhibition

erfolgte durch eine Punktmutation des Myr5-Gens in dem Bereich, der für die ATP-Bindung von Myr5 kodiert. Eine solche Punktmutation wies die Mutante Myr5-248 auf. Dabei erfolgte in der Kopf-Region von Myr5 ein Austausch der Aminosäure 244 von Glyzin durch Arginin (siehe Abb. 7).

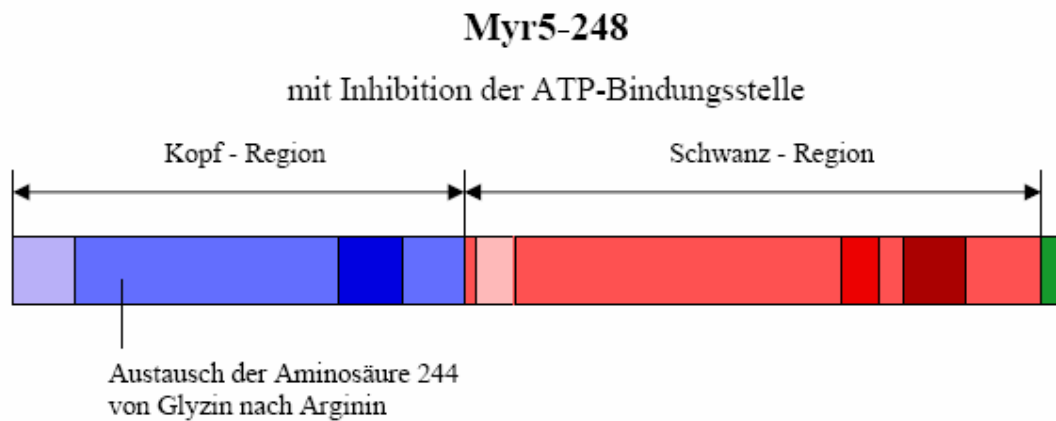


Abb. 7: Schematische Darstellung der Mutante Myr5-248; Farbkodierung der Domänen: siehe Abb. 2

Mit Myr5-248 wurden nun HeLa-Zellen transfiziert und mit *Shigella flexneri* SC301 infiziert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte man für Myr5-248 ein Rekrutierungsmuster beobachten, das dem von Myr5 entsprach, nämlich eine bevorzugte Lokalisation in den Spitzen der zellulären Protrusionen, die bei der Epithelzellinvasion durch *Shigella flexneri* entstehen (siehe Abb. 8). Dieses Ergebnis sprach gegen die aufgestellte Hypothese, dass die Rekrutierung von Myr5 zur bakteriellen Eintrittsstelle mit Hilfe der Myosin-Funktion entlang von Aktin erfolgt. Bei einer Infektion mit dem nichtinvasiven Stamm SC300 konnte keine Rekrutierung von Myr5-248 beobachtet werden.

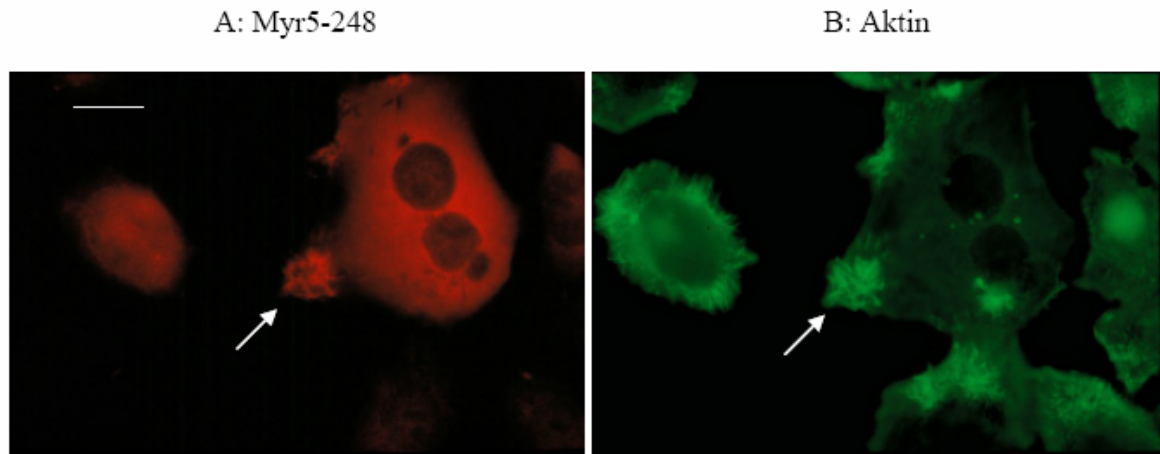


Abb. 8: Kolokalisation der ATP-Bindungsstelle negativen Mutante Myr5-248 (rot) mit Aktin (grün) an der bakteriellen Eintrittsstelle (Pfeil) bei der HeLa-Zellinvasion von *Shigella flexneri* SC301; A: Myr5-248 wurde mit einem gegen das HA-tag gerichteten Antikörper markiert und über einen Texas-Red-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt; B: identischer Bildausschnitt wie A, Aktin-Darstellung erfolgte mittels BODIPY FL Phalloidin. Weiße Markierung entspricht 10 μm .

3.3.2 Myr5-Rekrutierung ist unabhängig von der ATPase-Aktivität

Atypisches Myr5 besitzt wie das Muskelmyosin (Myosinklasse II) eine ATPase-Aktivität (4). Dabei wird von Adenosintriphosphat (ATP) ein Phosphatrest abgespalten und es entsteht Adenosindiphosphat (ADP). Bei dieser Reaktion wird die zur Wechselwirkung zwischen Aktin und Myosin benötigte Energie gewonnen. Bei einer Inhibition dieser ATPase-Aktivität erfolgt somit auch eine Inhibition der Myosin-Funktion des Myosins (81). Bei der Mutante Myr5-225 erfolgte in der Kopf-Region von Myr5 ein Austausch der Aminosäure 295 von Arginin durch Cystein und damit die Ausschaltung der ATPase-Aktivität von Myr5 (siehe Abb. 9).

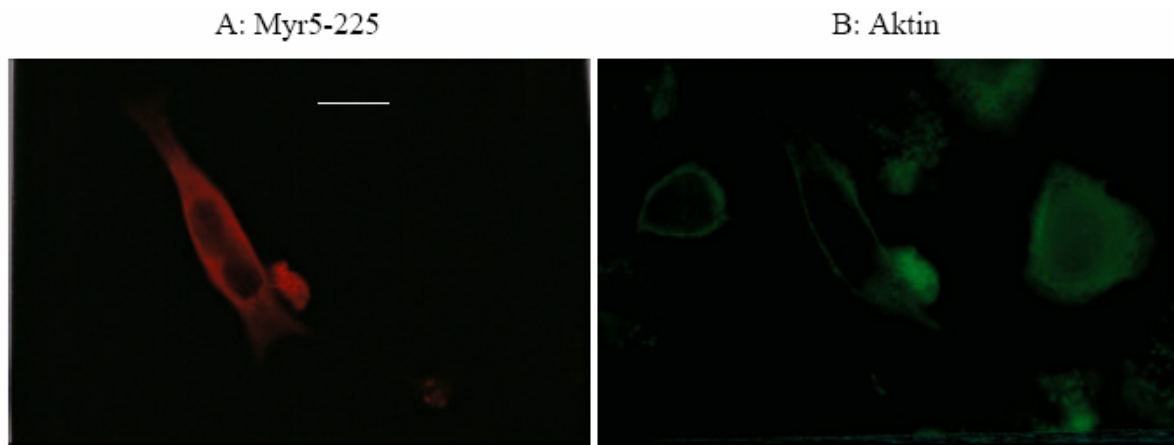


Abb. 9: Schematische Darstellung von Myr5-225; Farbkodierung der Domänen: siehe Abb. 2

Nach Transfektion von HeLa-Zellen mit Myr5-225 und anschließender Infektion mit *Shigella flexneri* SC301 zeigte die Fluoreszenzmikroskopie auch für Myr5-225 ein Rekrutierungsmuster, das dem von Myr5 entsprach, nämlich eine Rekrutierung in die Spitzen der Protrusionen der bakteriellen Eintrittsstelle. Bei einer Infektion mit dem nicht-invasiven Stamm SC300 blieb dieses Rekrutierungsmuster von Myr5-225 aus (siehe Abb. 10). Diese Ergebnisse, nämlich die Rekrutierung von Myr5 zur bakteriellen Eintrittsstelle trotz inhibierter ATPase-Aktivität bzw. inhibierter ATP-Bindung (siehe 3.3.), widerlegten somit die Hypothese, dass die durch den Invasionsprozess von *Shigella flexneri* induzierte Rekrutierung von Myr5 von dessen Myosin-Funktion abhängig ist.

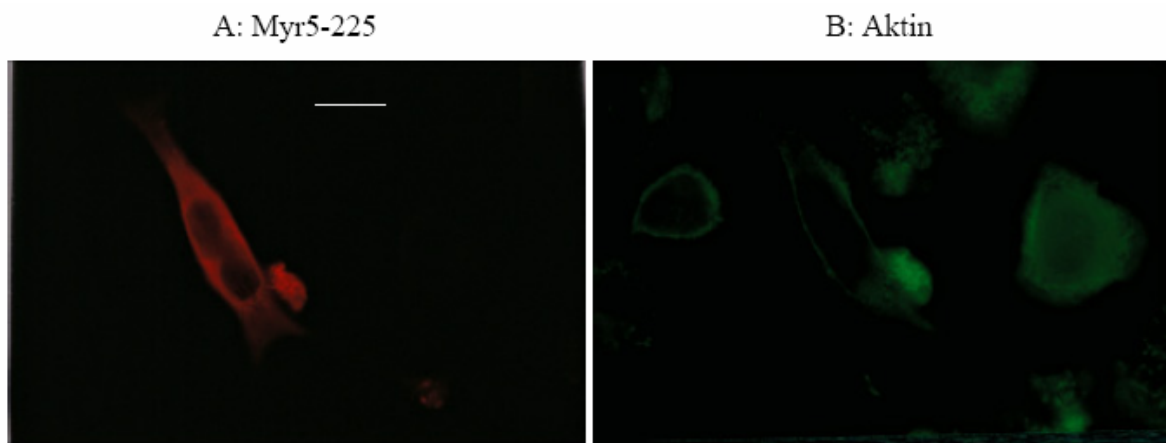


Abb. 10: Kolokalisation der ATPase-negativen Mutante Myr5-225 (rot) mit Aktin (grün) an der bakteriellen Eintrittsstelle bei der HeLa-Zellinvasion von *Shigella flexneri* SC301; A: Myr5-225 wurde mit einem gegen das HA-tag gerichteten Antikörper markiert und über einen Texas-Red-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt; nur transfizierte Zellen sichtbar; B: identischer Bildausschnitt wie A, Aktin-Darstellung erfolgte mittels Phalloidin. Weiße Markierung entspricht 10 µm.

3.4. Rekrutierungsverhalten von Myr5 und Rho

Rho ist ein kleines regulatorisches Guaninnukleotid-bindendes Protein (G-Protein), welches für die *Shigella flexneri*-Epithelzellinvasion essentiell ist (37, 59). Während der Zytoskelettveränderungen, die bei der Infektion mit *Shigella* zur Ausbildung einer blütenähnlichen Membranstruktur an der Eintrittsstelle und schließlich zur Aufnahme des Bakteriums führen, bündelt und stabilisiert Rho filamentäres Aktin (37, 61). Dabei wurden für die verschiedenen Isoformen von Rho unterschiedliche Rekrutierungsmuster beobachtet. Während RhoA in unmittelbarer Nähe um die Bakterien herum akkumuliert, werden RhoB und RhoC in die Protrusionen der blütenähnlichen Struktur rekrutiert (37).

Myr5 besitzt in der Schwanz-Region ein Modul, das Myr5 zu einem GAP-Protein (GTPase activating protein) macht. Diese GAP-Funktion von Myr5 katalysiert eine Reaktion, bei der Rho von einem GTP-gebundenen, aktiven Zustand in einen GDP-gebundenen, inaktiven Zustand überführt wird (63).

Da Myr5 und Rho miteinander interagieren (63) und beide in die bakterielle Invasionszone rekrutiert werden, wurde nun untersucht, inwiefern sich die Rekrutierungsmuster beider Proteine ähneln. Dazu wurden HeLa-Zellen mit Myr5 und RhoA, RhoB, oder RhoC doppeltransfiziert. Dabei fand sich für Myr5 und RhoB bzw. RhoC ein einheitliches Rekrutierungsmuster, nämlich eine Akkumulation in den Protrusionen (siehe Abb. 11 und Abb. 12). Für Myr5 und RhoA konnte jedoch keine Kolo-kalisation beobachtet werden, da RhoA nicht in den Spitzen der Protrusionen, sondern um die Bakterien herum akkumulierte (siehe Abb. 13).

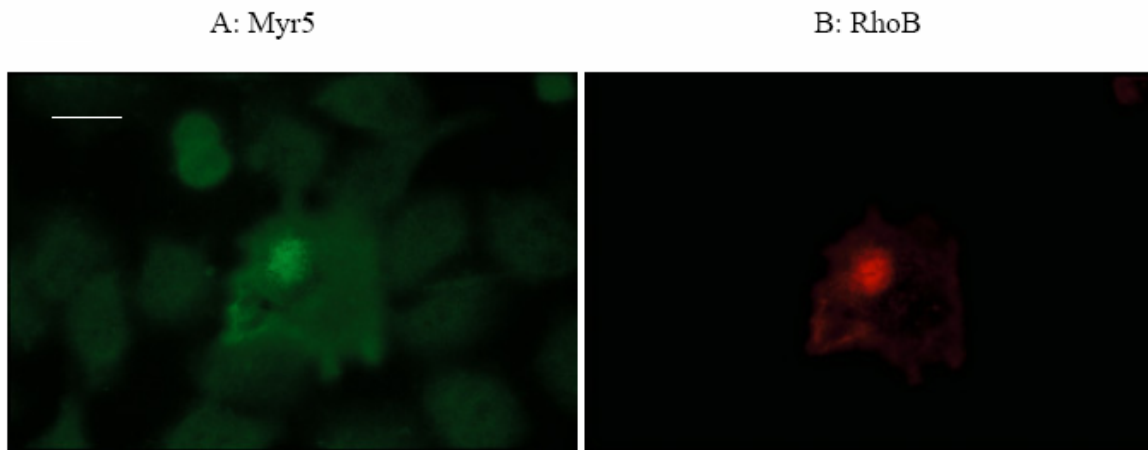


Abb. 11: Kolokalisation von Myr5 (grün) und RhoB (rot) in den Protrusionen der bakteriellen Eintrittsstelle während der HeLa-Zellinvasion von *Shigella flexneri* SC301; A: Myr5 wurde mit einem gegen das HA-tag gerichteten Antikörper markiert und über einen Fluoreszein-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt; B: identischer Bildausschnitt wie A, RhoB wurde mit einem gegen sein VSV-tag gerichteten Antikörper markiert und über einen Texas-Red-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt. Weiße Markierung entspricht 10 μm .

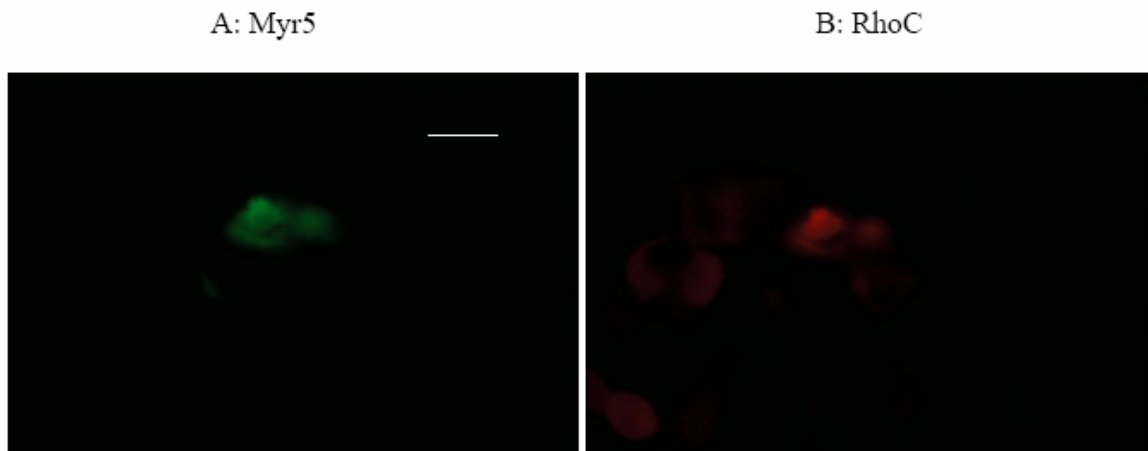


Abb. 12: Kolokalisation von Myr5 (grün) und RhoC (rot) in den Protrusionen der bakteriellen Eintrittsstelle während der HeLa-Zellinvasion von *Shigella flexneri* SC301; A: Myr5 wurde mit einem gegen das HA-tag gerichteten Antikörper markiert und über einen Fluoreszein-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt; B: identischer Bildausschnitt wie A, RhoC wurde mit einem gegen sein VSV-tag gerichteten Antikörper markiert und über einen Texas-Red-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt. Weiße Markierung entspricht 10 μm .

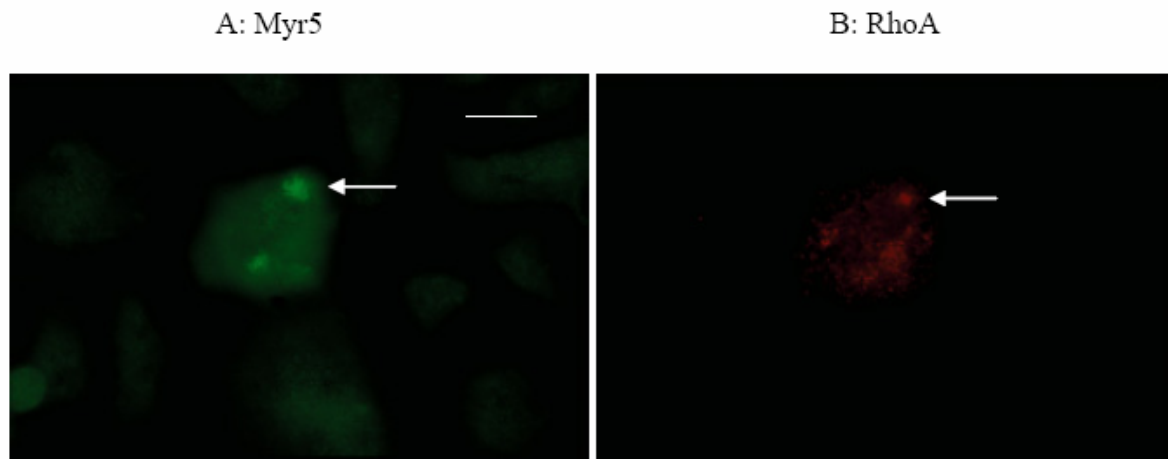


Abb. 13: Parallele Darstellung von Myr5 und RhoA auf einer Ebene. Während RhoA (rot) bei der Epithelzellinvasion von *Shigella flexneri* um das Bakterium herum akkumuliert (Pfeil), reichert sich Myr5 (grün) in den zellulären Protrusionen (Pfeil) an; A: Myr5 wurde mit einem gegen das HA-tag gerichteten Antikörper markiert und über einen Fluoreszein-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt; B: identischer Bildausschnitt wie A, RhoA wurde mit einem gegen sein VSV-tag gerichteten Antikörper markiert und über einen Texas-Red-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt. Weiße Markierung entspricht 10 µm.

3.5. Von der GAP-Funktion unabhängige Myr5-Rekrutierung in die bakterielle Invasionszone

Die Proteine Myr5 und RhoB/C wiesen bei der Epithelzellinvasion durch *Shigella flexneri* ein einheitliches Rekrutierungsmuster auf und können über das GAP-Modul von Myr5 miteinander interagieren. Nun lag es nahe zu prüfen, ob die Interaktion der beiden Proteine über die GAP-Funktion von Myr5 im Zusammenhang mit der einheitlichen Rekrutierung der beiden Proteine steht. Dazu wurde eine Myr5-Mutante benutzt, deren GAP-Funktion durch eine Punktmutation ausgeschaltet wurde. Eine solche Punktmutation wies Myr5-250 auf. Dabei erfolgte in der Schwanz-Region von Myr5 ein Austausch der Aminosäure 1695 von Arginin durch Methionin (siehe Abb. 14).

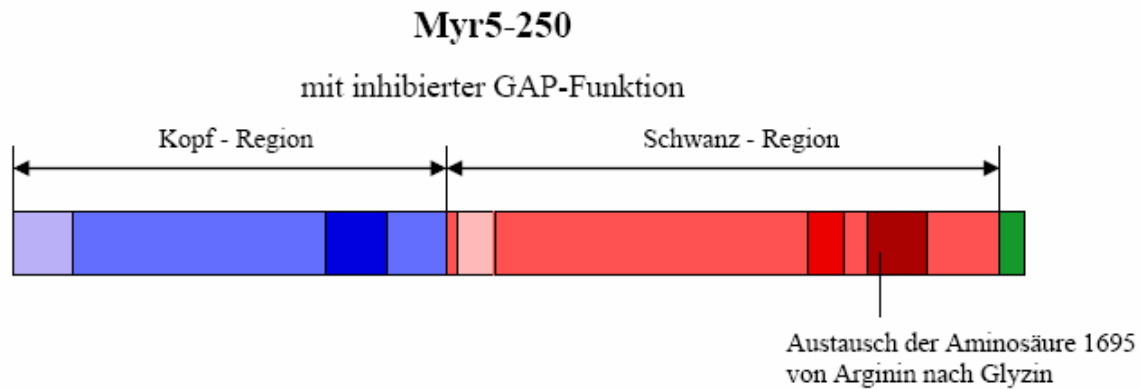


Abb. 14: Schematische Darstellung der Mutante Myr5-250; Farbkodierung der Domänen: siehe Abb. 2

Mit dieser Mutante Myr5-250 wurden HeLa-Zellen transfiziert und dann mit *Shigellen* infiziert. Anschließend erfolgte die Darstellung über indirekte Immunfluoreszenz. Dabei konnte für Myr5-250 genau wie für Myr5 eine Rekrutierung in die Spitzen der Protrusionen der bakteriellen Eintrittsstellen sowie eine Kolo-kalisation von Myr5-250 und Aktin, das mit Phalloidin gefärbt worden war, beobachtet werden. Allerdings entstand der Eindruck, dass die bakteriellen Invasionsstellen bei den mit Myr5-250 transfizierten Zellen eine etwas andere Form aufwiesen als bei den mit Myr5 transfizierten Zellen. Dabei hatte es den Anschein, als ob die mit der GAP-negativen Mutante transfizierten Zellen weniger Protrusionen aufwiesen, was der Eintrittsstelle eine kleinere, kompaktere Form gab (siehe Abb. 15). Bei einer Infektion mit dem nichtinvasiven Stamm SC300 konnte keine Rekrutierung von Myr5-250 beobachtet werden.

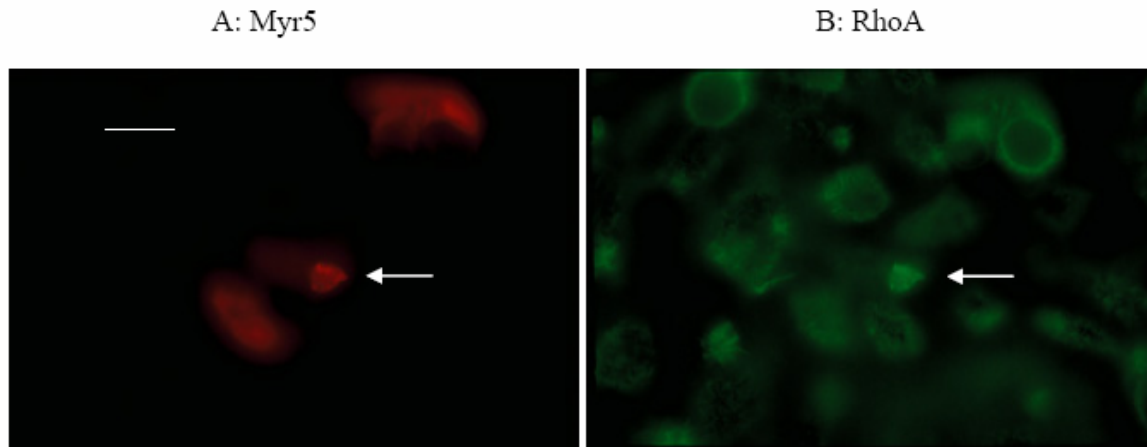


Abb. 15: Kolokalisation der GAP-negativen Mutante Myr5-250 (rot) mit Aktin (grün) an der bakteriellen Eintrittsstelle (Pfeil) bei der HeLa-Zellinvasion von *Shigella flexneri* SC301; A: Myr5-250 wurde mit einem gegen das HA-tag gerichteten Antikörper markiert und über einen Fluoreszein-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt; B: identischer Bildausschnitt wie A, Aktin-Darstellung erfolgte mittels BODIPY FL Phalloidin. Weiße Markierung entspricht 10 μm .

3.6. Einheitliche Rekrutierung von Myr5 und Myr5-GAP⁻

Da der Eindruck entstanden war, dass die bakteriellen Eintrittsstellen bei einer Transfektion der HeLa-Zellen mit der GAP-negativen Mutante Myr5-250 weniger Protrusionen aufwiesen, war es sinnvoll zu prüfen, ob es doch unterschiedliche Rekrutierungsmuster für Myr5 und Myr5-250 gibt. Dafür mussten HeLa-Zellen mit Myr5 und Myr5-250 doppeltransfiziert werden. Da beide Proteine ein HA-tag besaßen, für die parallele Darstellung jedoch unterschiedliche tags benötigt wurden, war es zunächst erforderlich, eines der beiden Proteine mit einem neuen tag zu versehen. Dazu wurde aus dem Konstrukt Myr5-Flag-tag in pUHD 310/311 das Flag-tag über die Schnittstellen NdeI und Eco32I herausgeschnitten. Anschließend wurde über die gleichen Schnittstellen ein hybridisiertes Oligonukleotid wieder einkloniert. Das Ergebnis war Myr5-VSV-tag im Vektor pUHD 310/311. Diese Klonierungsstrategie ist noch einmal in Abb. 16 und Abb. 17 zusammengefasst.

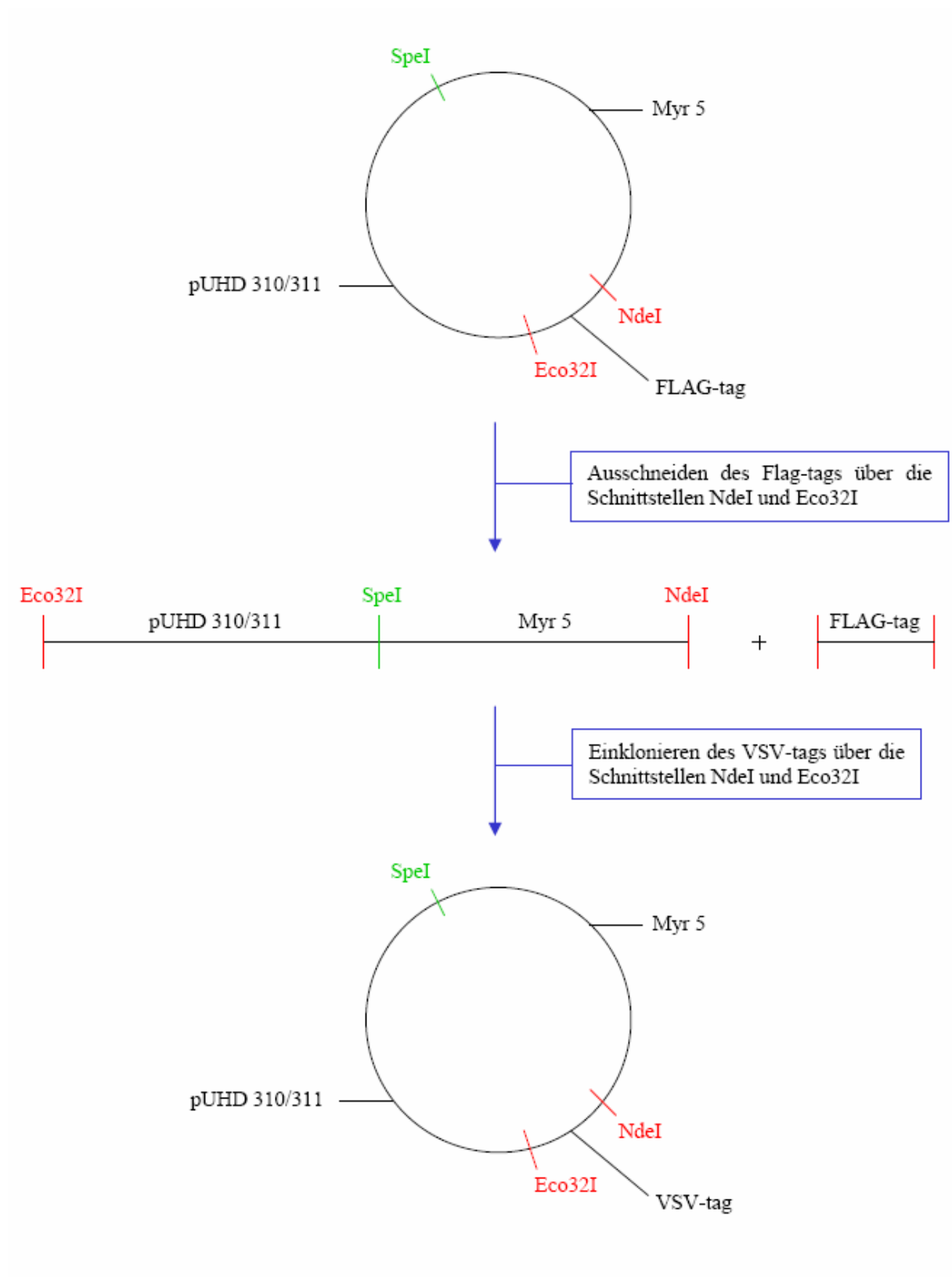


Abb. 16: Darstellung der Methode zur Herstellung des Konstruktes Myr5-VSV-tag in pUHD 310/311.

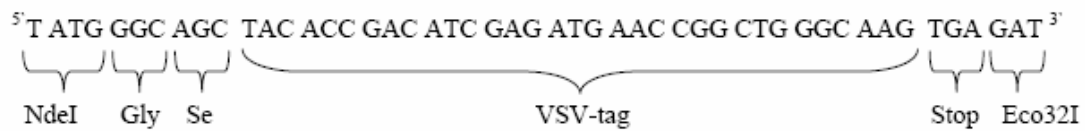
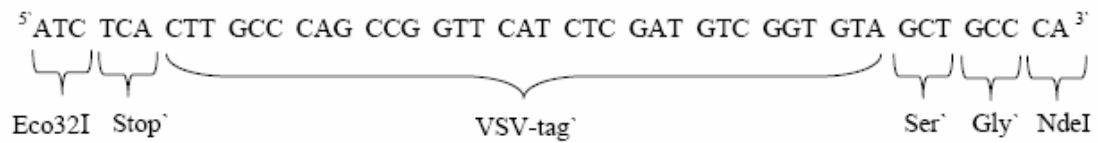
Oligonukleotid 1Oligonukleotid 2

Abb. 17: Sequenzen der VSV-tag-Oligonukleotide

Nun wurden HeLa-Zellen mit Myr5-VSV-tag und Myr5-250-HA-tag doppeltransfiziert und anschließend mit *Shigella flexneri* SC301 infiziert. Anschließend erfolgte die Darstellung über indirekte Immunfluoreszenz. Dabei zeigte sich eine identische Rekrutierung für Myr5 und die GAP-negative Mutante Myr5-250, so dass sich der zuvor gewonnene Eindruck der unterschiedlichen Rekrutierung nicht bestätigte (siehe Abb. 18).

Gelb = Kolokalisation

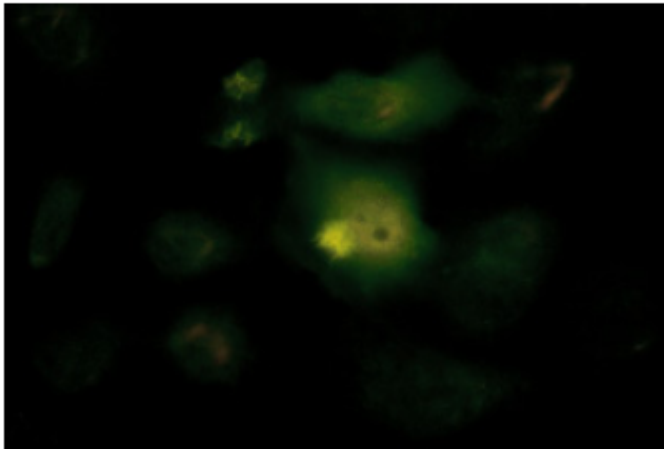


Abb. 18: Zweifach belichtete Aufnahme einer mit Myr5 und Myr5-250 doppeltransfizierten HeLa-Zelle; Kolokalisation der beiden Proteine am Invasionsort (Pfeil) von *Shigella flexneri* SC301; Myr5 (rot) wurde mit einem gegen das VSV-tag gerichteten Antikörper markiert und über einen Texas-Red-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt; Myr5-250 wurde mit einem gegen das HA-tag gerichteten Antikörper markiert und über einen Fluoreszein-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt. Weiße Markierung entspricht 10 μ m.

3.7. Verringerung der Infektionseffizienz durch Myr5

Die GTPase Rho ist essentiell für die *Shigellen*-induzierten Zytoskelettveränderungen und daher essentiell für den Invasionsprozess von *Shigella flexneri* (37). Wird Rho spezifisch inhibiert, z.B. mit dem *Clostridium botulinum* toxin C3 (60), so wird dadurch auch die Shigelleninvasion inhibiert (37).

Myr5 besitzt mittels seiner GAP-Funktion die Eigenschaft, Rho sowohl *in vitro* (63) als auch *in vivo* (73) in einen GDP-gebundenen, inaktiven Zustand überführen zu können. Damit ist Myr5 möglicherweise ein physiologischer Inaktivator von Rho. Nun war zu klären, ob Myr5 einen funktionellen Einfluss auf die Invasionseffizienz von *Shigella flexneri* besitzt.

Dazu wurden quantitative Invasionsexperimente mit *Shigella flexneri* durchgeführt. Nach der Infektion der HeLa-Zellen wurden extrazelluläre *Shigellen* mit Gentamicin abgetötet, während bereits eingedrungene Bakterien zu intrazellulären Mikrokolonien heranwuchsen.

Um eine interzelluläre Ausbreitung der Bakterien zu verhindern, wurde der invasive Stamm SC560 benutzt. Dieser ist IcsA-negativ und dadurch weder zu intrazellulärer noch zu interzellulärer Bewegung fähig (38, 33). Zur Darstellung wurden die Bakterien mit dem Primärantikörper anti-LPS-*Shigella flexneri*-Kaninchen markiert und mit einem Fluoreszeingekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Myr5 wurde mit dem Primärantikörper anti-HA-tag-Maus markiert und mit einem Texas-Red-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt.

Zur Beantwortung der Frage, ob Myr5 Einfluss auf die Infektionseffizienz von *Shigella flexneri* hat, wurden die Zellen nun auf die Eigenschaften Transfektionseffizienz von Myr5 (Kalziumphosphat-Präzipitation lieferte unterschiedliche Transfektionseffizienzen, nicht transfiziert, schwach transfiziert, mittelstark transfiziert, stark transfiziert = morphologische Veränderungen) und Infektion (infiziert, nicht infiziert) untersucht. Dabei zeigte sich, dass Myr5 die bakterielle Invasion in Abhängigkeit von der Transfektionseffizienz inhibiert. Bei schwach transfizierten Zellen konnte eine Invasionsinhibition von etwa 30%, bei mittelstark transfizierten Zellen von etwa 60% sowie bei stark transfizierten Zellen von 100% nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind graphisch in Tab. 8 und Abb. 19 dargestellt.

Tab. 8: Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 quantitativen Invasionsexperimenten (8A-8C).

Dabei wurden HeLa-Zellen mit Myr5 transfiziert, anschließend mit dem Shigellenstamm SC560 (siehe 4.1.4) infiziert und auf die Eigenschaften Transfektionseffizienz von Myr5 (nicht transfiziert, schwach transfiziert, mittelstark transfiziert, stark transfiziert) und Infektion (infiziert, nicht infiziert) untersucht. Die Anzahl der infizierten Zellen in Prozent wurde auf 100 % normalisiert. Aus diesen Werten wurden für die unterschiedlichen Transfektionseffizienzen der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet (8D, s entspricht der Standardabweichung).

8A

Transfektionseffizienz	Gesamtzellzahl	Infizierte Zellen	Infizierte Zellen in %	Normalisierung
nicht transfiziert	43569	293	0,67	100 %
schwach transfiziert	2231	7	0,31	46,27 %
mittelstark transfiziert	819	2	0,24	35,82 %
stark transfiziert	360	0	0	0 %

8B

Transfektionseffizienz	Gesamtzellzahl	Infizierte Zellen	Infizierte Zellen in %	Normalisierung
nicht transfiziert	68857	638	0,93	100 %
schwach transfiziert	2436	23	0,94	101,08 %
mittelstark transfiziert	1012	4	0,4	43,01 %
stark transfiziert	419	0	0	0 %

8C

Transfektionseffizienz	Gesamtzellzahl	Infizierte Zellen	Infizierte Zellen in %	Normalisierung
nicht transfiziert	92016	812	0,88	100 %
schwach transfiziert	2388	15	0,63	71,59 %
mittelstark transfiziert	637	2	0,31	35,23 %
stark transfiziert	109	0	0	0 %

8D

Transfektionseffizienz	8A	8B	8C	Mittelwert	s
nicht transfiziert	100 %	100 %	100 %	100 %	0
schwach transfiziert	46,27 %	101,08 %	71,59 %	72,98 %	22,40
mittelstark transfiziert	35,82 %	43,01 %	35,23 %	38,02 %	3,54
stark transfiziert	0 %	0 %	0 %	0 %	0

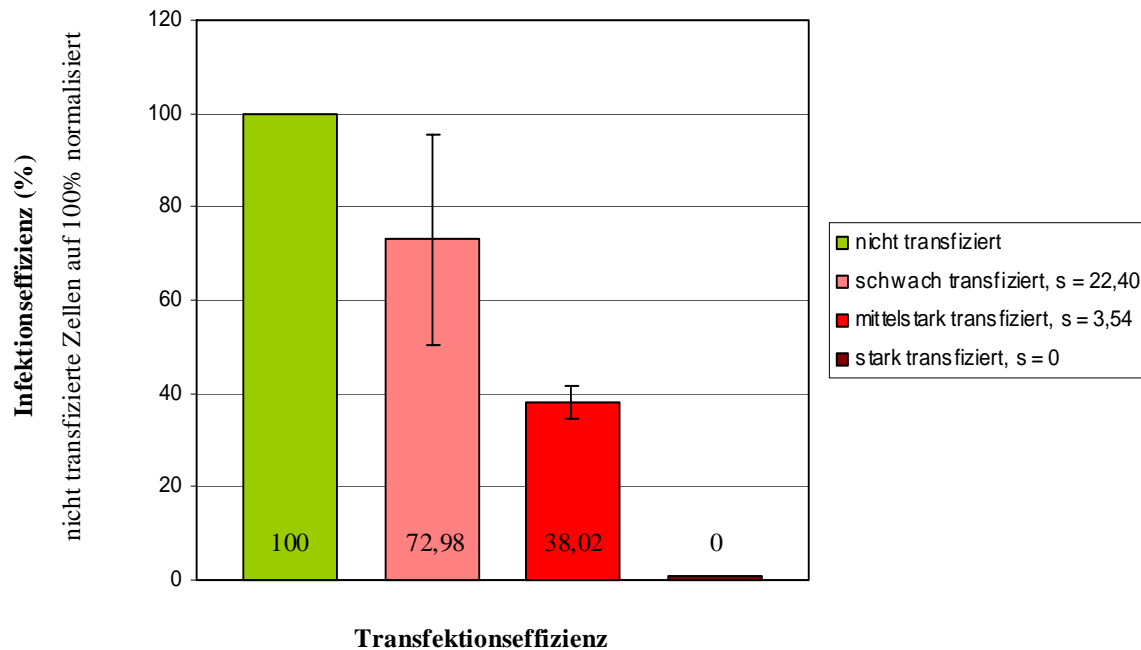


Abb. 19: Dargestellt ist die Effizienz der Infektion von HeLa-Zellen durch *Shigella flexneri* in Abhängigkeit von der Transfektionseffizienz von Myr5. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte, die aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten gewonnen wurden (siehe Tab. 8; s entspricht der Standardabweichung).

3.8. Steigerung der Infektionseffizienz durch Myr5-GAP⁻

Werden HeLa-Zellen mit Myr5 transfiziert und anschließend mit *Shigellen* infiziert, so zeigt sich eine von der Expressionseffizienz von Myr5 abhängige Infektionsinhibition (siehe 3.7.). Dieses Ergebnis ist höchstwahrscheinlich auf eine durch die GAP-Funktion von Myr5 bedingte Inhibition von Rho und damit verbundene verminderte Stabilisierung und Bündelung von filamentärem Aktin in den zellulären Protrusionen zurückzuführen.

Um diese Vermutung zu prüfen, wurden nun quantitative Invasionsexperimente durchgeführt, bei denen die HeLa-Zellen vor der Infektion mit *Shigella flexneri* SC560 mit der GAP-negativen Mutante Myr5-250 transfiziert wurden. Nach der Infektion wurden extrazelluläre Bakterien mit Gentamicin abgetötet. Zur Darstellung wurden die Bakterien mit dem Primärantikörper anti-LPS-*Shigella flexneri*-Kaninchen markiert und mit einem Fluoreszeingekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Myr5-250 wurde mit dem Primärantikörper anti-HA-tag-Maus markiert und mit einem Texas-Red-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt.

Wie bei den quantitativen Invasionsexperimenten mit Myr5 wurden die HeLa-Zellen nun auf die Eigenschaften Transfektionseffizienz und Infektion untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die GAP-negative Mutante die Shigelleninvasion in HeLa-Zellen fördert. Dabei scheint die Erhöhung der Infektionseffizienz von der Transfektionseffizienz abzuhängen, da die Infektionseffizienzsteigerung bei den schwächer transfizierten Zellen etwa 60% betrug und bei den stark transfizierten Zellen bei über 100% lag. Diese Resultate sind in Tab. und Abb. 20 zusammengefasst.

Tab. 9: Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 quantitativen Invasionsexperimenten (9A-9C).

Dabei wurden HeLa-Zellen mit GAP-negativem Myr5-250 transfiziert, anschließend mit dem Shigellenstamm SC560 (siehe 4.1.4) infiziert und auf die Eigenschaften Transfektionseffizienz von Myr5-250 (nicht transfiziert, schwach transfiziert, mittelstark transfiziert, stark transfiziert) und Infektion (infiziert, nicht infiziert) untersucht. Die Anzahl der infizierten Zellen in Prozent wurde auf 100% normalisiert. Aus diesen Werten wurden für die unterschiedlichen Transfektionseffizienzen der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet (9D; s entspricht der Standardabweichung).

9A

Transfektionseffizienz	Gesamtzellzahl	Infizierte Zellen	Infizierte Zellen in %	Normalisierung
nicht transfiziert	131039	924	0,71	100 %
schwach transfiziert	1579	21	1,33	187,32 %
mittelstark transfiziert	654	11	1,68	236,62 %
stark transfiziert	128	2	1,56	219,72 %

9B

Transfektionseffizienz	Gesamtzellzahl	Infizierte Zellen	Infizierte Zellen in %	Normalisierung
nicht transfiziert	132095	1795	1,36	100 %
schwach transfiziert	909	20	2,2	161,76 %
mittelstark transfiziert	435	9	2,07	152,21 %
stark transfiziert	143	4	2,8	205,88 %

9C

Transfektionseffizienz	Gesamtzellzahl	Infizierte Zellen	Infizierte Zellen in %	Normalisierung
nicht transfiziert	119455	801	0,67	100 %
schwach transfiziert	983	9	0,92	137,93 %
mittelstark transfiziert	405	4	0,99	147,76 %
stark transfiziert	110	2	1,82	271,64 %

9D

Transfektionseffizienz	9A	9B	9C	Mittelwert	s
nicht transfiziert	100 %	100 %	100 %	100 %	0
schwach transfiziert	187,32 %	161,76 %	137,93 %	162,34 %	20,17
mittelstark transfiziert	236,62 %	152,21 %	147,76 %	178,86 %	40,88
stark transfiziert	219,72 %	205,88 %	271,64 %	232,41 %	28,31

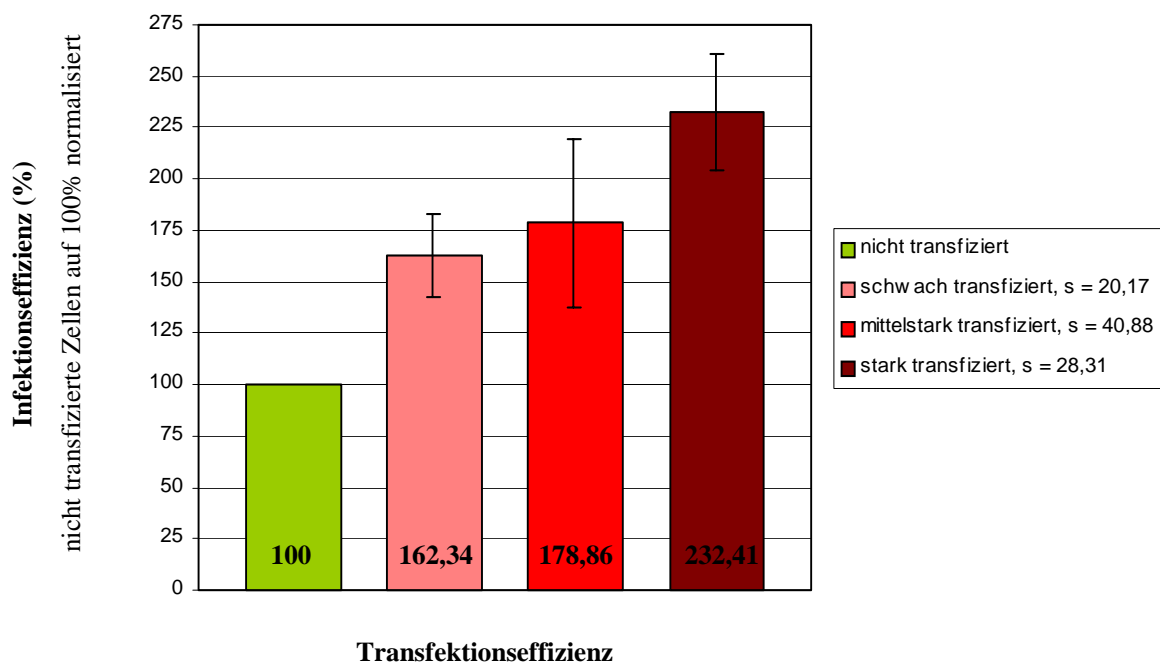


Abb. 20: Dargestellt ist die Effizienz der Infektion von HeLa-Zellen durch *Shigella flexneri* in Abhängigkeit von der Transfektionseffizienz von GAP-negativem Myr5-250. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte, die aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten gewonnen wurden (siehe Tab.; s entspricht der Standardabweichung).

4. Diskussion

Shigellen sind die Erreger der bakteriellen Ruhr. Dabei ist die Invasion der *Shigellen* in die Epithelzellen der Darmschleimhaut ein wesentlicher Schritt des Pathomechanismus. Während des Invasionsprozesses kommt es zu *Shigellen*-induzierten Zytoskelettveränderungen, die zur Ausbildung einer blütenartigen Membranstruktur um das Bakterium herum und schließlich zu einer Aufnahme des Bakteriums führen (9). Es wurden nun Untersuchungen zum Rekrutierungsmechanismus und zur funktionellen Rolle von Myr5, einem nicht konventionellen Myosin der Klasse IX, bei der *Shigellen*invasion durchgeführt.

4.1. Diskussion der Methoden

4.1.1 Verwendete Zelllinie

Für die Studien wurde Myr5 in HeLa-Zellen, epitheliale Zellen eines Zervixkarzinoms (78), zur Expression gebracht. Im Gegensatz zu den polarisierten Enterozyten des Gastrointestinaltraktes sind HeLa-Zellen nicht polarisiert. *Shigella* kann die polarisierten Enterozyten von basolateral, nicht jedoch von apikal infizieren (27). Dies wurde *in vitro* auch für die polarisierten Caco2-Zellen gezeigt (27, 82, 83). Da mittels Mikroskop die Zellen von “oben“ betrachtet werden, hätten wir bei der Verwendung von polarisierten Zellen für unsere Studien, wie z.B. Caco2-Zellen, die bakteriell induzierten Zytoskelettveränderungen somit nur seitlich beurteilen können. HeLa-Zellen boten uns aufgrund der Tatsache, dass *Shigella* die gesamte Oberfläche dieser Zellen zur Invasion nutzen konnte, die Möglichkeit, die morphologischen Zellveränderungen auch horizontal im Querschnitt zu beurteilen.

4.1.2 Transfektionsmethode

Als Transfektionsmethode wurde die Kalziumphosphat-Präzipitation gewählt, da sie u.a. unterschiedliche Expressionsniveaus der Proteine und hohe Transfektionsraten, wie für die quantitativen Invasionsexperimente benötigt, lieferte. Wir zogen die Kalziumphosphat-Präzipitation der Mikroinjektion von DNA vor, da sie weniger zeitaufwendig war.

Die Lipidtransfektion, eine weitere Alternative zur Kalziumphosphat-Präzipitation, hat den Nachteil der Lipideinlagerungen in die Zellmembran. Da die bakterielle Infektion in engem

Zusammenhang zur Zellmembran steht und somit die veränderte Membranzusammensetzung zur Beeinflussung der Shigelleninfektion und dadurch zu verfälschten Ergebnissen führen könnte, entschieden wir uns für die Kalziumphosphat-Präzipitation.

4.1.3 Auswahl der Bakterienstämme

Der Stamm *Shigella flexneri* SC301 besitzt das Plasmid IL-22, welches aus uropathogenen *E.coli* isoliert wurde und für die Bildung von afimbriärem Adhäsins kodiert. Dadurch erlangt dieser Stamm Zelladhärenz, wodurch seine Infektionseffizienz deutlich über der des Wildtyps M90T liegt. Um bei den Untersuchungen der Morphologie der bakteriell induzierten Zytoskelettveränderungen sowie der Rekrutierungsmuster von Myr5, Aktin und Rho möglichst viele Infektionsereignisse beurteilen zu können, verwendeten wir dabei daher den Shigellenstamm SC301 bzw. als Kontrolle den adhären, apathogenen Stamm SC300.

Für die Darstellung von *Shigella* in den zellulären Protrusionen war SC301 jedoch nicht geeignet. Aufgrund der Adhärenz von SC301 waren die Zellen bei einer Infektion mit diesem Stamm “übersät” von Bakterien, und diese ließen sich auch durch mehrfaches Waschen nicht von den HeLa-Zellen ablösen. Daher war es nahezu unmöglich, den bakteriell induzierten Membranausstülpungen die sie auslösenden Bakterien zuzuordnen. Der Wildtyp M90T und der als Kontrolle eingesetzte apathogene Stamm BS176, die keine Zelladhärenz besitzen und daher zur Erhöhung der Infektionseffizienz auf die Zellen zentrifugiert wurden, ließen sich dagegen durch mehrfaches Waschen problemlos von den Zellen entfernen, so dass nur noch die bereits von den Membranausstülpungen umschlungenen Bakterien an der Zelloberfläche verblieben und somit eine parallele Darstellung des Bakteriums und der zugehörigen Membranveränderung möglich war.

Der IcsA-negative Stamm SC560 fand aufgrund seiner fehlenden intra- und interzellulären Bewegung bei den quantitativen Invasionsexperimenten Verwendung (siehe 4.1.4).

4.1.4 Quantitative Invasionsexperimente

Mit den quantitativen Invasionsexperimenten wurde der Einfluss von Myr5 bzw. Myr5-250 auf die Effizienz der primären, von extrazellulär erfolgenden HeLa-Zell-Infektion durch *Shigella* getestet. Dabei wurden infizierte Zellen anhand intrazellulär wachsender Bakterienkolonien identifiziert. Da *Shigellen* aufgrund der interzellulären Bewegung auch benachbarte Zellen infizieren können, wäre es bei der Verwendung des Wildtyps unmöglich

gewesen, primär durch *Shigella* infizierte Zellen von sekundär durch interzelluläre Ausbreitung infizierten Zellen zu unterscheiden. Aus diesem Grund wurde für die quantitativen Invasionsexperimente der IcsA-negative Stamm *Shigella flexneri* SC560, der nicht zu intra- und interzellulärer Bewegung fähig ist, verwendet. Die intrazellulären Bakterienkolonien wurden mittels *Shigellen*-spezifischen Antikörpern markiert und anschließend mit grün-fluoreszierenden Sekundärantikörpern gefärbt. Parallel wurde Myr5 bzw. Myr-250 mit HA-tag-Antikörpern markiert und dann rot-fluoreszierend dargestellt. Beim Auszählen der Zellen zeigte sich, dass die Infektionseffizienz nicht nur von Experiment zu Experiment, sondern auch innerhalb eines Experimentes auf den einzelnen Deckgläschen selbst variierte. Daher wurden die Deckgläschen beim Auszählen der Zellen meanderförmig, vollständig „durchmikroskopiert“, um sowohl die Bereiche mit einer hohen Infektionseffizienz als auch die Bereiche von niedriger Infektionseffizienz zu erfassen und somit eine Selektion zugunsten von infizierten Zellen zu vermeiden.

4.1.5 Konstrukt Myr5-VSV-tag

Um Myr5 und Myr5-250 parallel immunfluoreszenzmikroskopisch darstellen zu können, war es nötig, das HA-tag von Myr5 durch ein anderes tag zu ersetzen. Der erste Gedanke, um dies zu realisieren, war, das HA-tag aus „unserem Standard-Myr5 im Vektor pUHD“ herauszuschneiden und anschließend ein neues tag einzuklonieren. Das war nicht möglich, da bei der Herstellung des Konstruktes Myr5-HA-tag im Vektor pUHD die Schnittstelle zwischen Myr5 und dem tag verloren ging und somit das HA-tag nicht isoliert werden konnte. Daher bezogen wir von Prof. Martin Bähler das Konstrukt Myr5-Flag-tag im Vektor pUHD. Dieses Konstrukt konnten wir für die parallele Darstellung jedoch nicht nutzen, da der Primärantikörper gegen das Flag-tag mit einem uns unbekannten Protein, das ebenfalls in die Invasionszone rekrutiert wird, kreuzreagierte. Jedoch gab uns dieses Konstrukt aufgrund der Tatsache, dass es zwischen Myr5 und dem Flag-tag eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym besaß, die Möglichkeit, das Flag-tag auszuschneiden und anschließend über die gleichen Schnittstellen ein für ein VSV-tag kodierendes, hybridisiertes Oligonukleotid wieder in den Vektor einzuklonieren. Das Ergebnis war das Konstrukt Myr5 mit einem C-terminalem VSV-tag im Vektor pUHD.

4.2. Untersuchungen zum Rekrutierungsmechanismus von Myr5 während der Epithelzellinvasion durch *Shigella flexneri*

Zunächst interessierte die Frage, auf welche Art und Weise Myr5 in die bakterielle Invasionszone rekrutiert wird.

Für eukaryote Zellen sind verschiedene intrazelluläre Transportmechanismen beschrieben. Einige davon beruhen auf der Interaktion zwischen Aktin und verschiedenen nicht konventionellen Myosinen. Es wurde gezeigt, dass das 95F Myosin, ein nicht konventionelles Myosin der Klasse VI, ein Transportprotein für Zytoplasmapartikel in *Drosophila* ist. Dabei bewegt sich das 95F Myosin ATP-abhängig entlang von filamentärem Aktin (84). Für nicht konventionelle Myosine der Klasse V, wie z.B. Myo2-66, sind ebenfalls Transportfunktionen für sekretorische Vesikel und Vesikel des endoplasmatischen Retikulums entlang von Aktinfilamenten beschrieben (85, 86, 87). Auch Myosin-IXb (M9b), ein humanes Myosin der Klasse IX, das eine hohe Homologie zu Myr5 aufweist und wie dieses eine GAP-Aktivität besitzt (70, 71), kann sich entlang von Aktinfilamenten bewegen (71). Diese Beobachtungen und die Tatsache, dass Myr5 und Aktin in der bakteriellen Invasionszone kolokalisieren (siehe 3.2.), führten zu der Hypothese, dass auch die Rekrutierung von Myr5 Aktin-abhängig sein könnte. Diese Hypothese wurde getestet, indem HeLa-Zellen mit Myr5-Mutanten, Myr5-225 und Myr5-248, transfiziert wurden, deren ATPase-Funktion bzw. ATP-Bindungsstelle und damit die Fähigkeit, mit Aktin zu interagieren, durch Punktmutationen inhibiert waren. Bei der anschließenden Infektion mit *Shigella flexneri* zeigten diese Mutanten das gleiche Rekrutierungsmuster wie Myr5. Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse ist die Tatsache, dass es sich bei den verwendeten Myr5-Konstrukten um putative Mutanten handelt. Putativ heißt, dass der Verlust der ATP-Bindungsfähigkeit bzw. der ATPase-Funktion durch die jeweiligen Punktmutationen zwar für das konventionelle Myosin jedoch nicht für diese Mutanten experimentell belegt ist. So könnte es sein, dass die Punktmutation im Kopfbereich dieser Mutanten nicht zu einer Inhibition der Myosin-Funktion führt. Dagegen sprechen jedoch kürzlich in der AG Adam gewonnene Daten (noch unveröffentlicht), die für Myr5 und diese Mutanten eine unterschiedliche Rekrutierung bei der intra- und interzellulären Bewegung beschreiben. Zur IcsA-abhängigen, intra- und interzellulären Bewegung induziert *Shigella* eine polarisierte Aktinpolymerisation, die zur Ausbildung eines Aktinschweifes führt (32, 33). Für Myr5 konnte eine Rekrutierung in diese Schweifstruktur beobachtet werden, wohingegen Myr5-225 und Myr5-248 nicht in den Aktinschweif akkumulierten. Dies

spricht dafür, dass die Myr5-Rekrutierung in die Aktinschweife in Abhängigkeit von der Myosin-Funktion erfolgt.

Im Gegensatz dazu ist die Hypothese der Aktin-abhängigen Rekrutierung von Myr5 in die bakterielle Invasionszone aufgrund unserer Ergebnisse eher unwahrscheinlich. Eine mögliche Erklärung dieses Ergebnisses ist die Tatsache, dass Myr5 nicht in der Lage ist, coiled-coil-Formationen in der Schwanz-Region zu bilden (63). Diese coiled-coil-Formation ist eine Zusammenlagerung von zwei oder mehr Myosin-Proteinen im Bereich der Schwanz-Region, so dass die zugehörigen Myosin-Kopf-Regionen als "Einheit" mit Aktin interagieren. Die coiled-coil-Formation, wie sie für das Muskelmyosin der Klasse II und die o.a. "Transport-Myosine" der Klassen V und VI sowie für Myr7, einem weiteren Myosin der Klasse IX, das im Gehirn der Ratte identifiziert werden konnte, beschrieben wurden (72, 88, 89, 90, 91), verbindet somit die an Aktin gebundenen Myosin-Kopf-Regionen in der Schwanz-Region untereinander und hat dadurch eine entscheidende Bedeutung für die gerichtete Bewegung von Myosin entlang von Aktin. Denn wahrscheinlich wird durch die gleichzeitige Aktinbindung von in der Schwanz-Region untereinander verbundenen Myosinen während des Querbrückenzyklusses ein Abdiffundieren der einzelnen Myosin-Kopf-Region von Aktin verhindert.

Ein weiterer Mechanismus, der für die intrazelluläre Rekrutierung von Myr5 in Frage kommt, ist der Transport entlang von Mikrotubuli, wie er für die Proteine Kinesin und Dynein beschrieben wurde. Diese sind in der Lage, sich ATP-abhängig entlang von Mikrotubuli fortzubewegen (92). Ein Beispiel für diesen Mechanismus ist der gerichtete Transport von Golgi-Vesikeln in polarisierten Epithelzellen. Dabei werden die Vesikel an Dynein gebunden und entlang von Mikrotubuli zum apikalen Pol der Epithelzelle transportiert (93). Es ist vorstellbar, dass Myr5 über einen solchen Mechanismus, z.B. an Dynein oder Kinesin gebunden, zur bakteriellen Eintrittsstelle transportiert wird. Diese Hypothese könnte in weiteren Studien getestet werden, indem man die Bildung von Mikrotubuli mit Nocodazol inhibiert (94) und anschließend die Rekrutierung von Myr5 während der Epithelzellinvasion durch *Shigella* überprüft.

Auch Diffusion kommt für die Akkumulation von Myr5 in der Invasionszone in Frage. Es wäre möglich, dass Myr5 in der Invasionszone an das filamentäre Aktin bindet und so innerhalb der Zelle ein Konzentrationsgradient für "freies" Myr5 entsteht. Durch Brown-Molekularbewegung würde dann mehr und mehr Myr5 zur Eintrittsstelle diffundieren und an Aktin binden und somit dort akkumulieren. Ob die langsam erfolgende Diffusion, die ein Mechanismus von geringer Kinetik ist, für die Myr5-Akkumulation verantwortlich ist, bleibt

insbesondere aufgrund der Tatsache, dass die Myr5-Akkumulation schnell erfolgt und somit ein Prozess hoher Kinetik ist, aber fraglich.

Myr5 unterscheidet sich von den anderen nicht konventionellen Myosinen unter anderem dadurch, dass es in der Schwanz-Region eine GAP-Domäne besitzt und somit ein GTPase-activating protein (GAP-Protein) ist (63). Über diese GAP-Domäne kann Myr5 mit den GTPasen der Rho-Gruppe, Rho, Rac und CDC42 interagieren (63). Diese GTPasen der Rho-Gruppe sind für die Regulation des Zytoskelettes, insbesondere für die intrazelluläre Aktinorganisation, von großer Bedeutung (95, 96). Während Rac die Bildung von blattähnlichen Membranfalten, den sogenannten Lamellipodien, reguliert (55, 97), ist CDC42 u.a. für die Bildung von kleinen Mikrospikes, den Filopodien, verantwortlich (55, 98). Rho seinerseits reguliert die Bildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionsplaques (55, 56). Dabei induzieren Rac und CDC42 direkt die Aktinpolymerisation, wohingegen Rho filamentäres Aktin bündelt und stabilisiert (61, 99). Myr5 interagiert mit diesen Proteinen, indem es mit seiner GAP-Domäne an diese bindet und sie in einen GDP-gebundenen Zustand überführt und dadurch inaktiviert. Dies wurde für die Ras-verwandten GTPasen der Rho-Gruppe, RhoA, RhoB, RhoC, CDC42 und Rac, gezeigt (63, 100).

Da sowohl Myr5 als auch Rho in der bakteriellen Invasionszone akkumulieren und beide Proteine in einem funktionellen Zusammenhang stehen, wurde nun untersucht, inwiefern sich die Rekrutierungsmuster dieser Proteine während der Shigelleninvasion ähneln. Interessanterweise folgte Myr5 dem Rekrutierungsmuster von RhoB und RhoC und kolokalisierte mit diesen in den Spitzen der Protrusionen der blütenartigen Membranstruktur. Eine Kolokalisation mit RhoA konnte hingegen nicht beobachtet werden, da RhoA um die Bakterien herum akkumulierte (siehe 3.4.). Diese Beobachtungen festigen zum einen die Annahme, dass Myr5 auch mit RhoB und RhoC interagiert, und zum anderen die Hypothese, dass den Rho-Isoformen während der Epithelzellinvasion durch *Shigella* verschiedene Funktionen zukommen (37). Da RhoA bereits frühzeitig an der bakteriellen Kontaktstelle akkumuliert (AG Adam, unveröffentlichte Daten), wird vermutet, dass RhoA eher in der frühen initialen Phase der Aktinpolymerisation, direkt an der Kontaktstelle zwischen Zellwand und Bakterium, von Bedeutung ist, während RhoB und RhoC die Stabilisierung der Aktinfilamente bis in die Spitzen der blütenartigen Membranstruktur fortsetzen (37).

Aufgrund der Tatsachen, dass Myr5 mittels seiner GAP-Domäne an Rho binden kann (63) und Myr5 mit RhoB und RhoC am Invasionsort kolokalisiert, wurde nun geprüft, ob Myr5 und Rho gemeinsam rekrutiert werden. Dazu wurden Untersuchungen mit einer Myr5-

Mutante durchgeführt, deren GAP-Domäne durch eine Punktmutation variiert wurde. Für diese Mutante wurde gezeigt, dass sie keine GAP-Aktivität mehr besitzt (73). Bei den Untersuchungen wurde auch für die Myr5-Mutante mit inhibierter GAP-Aktivität ein Rekrutierungsmuster beobachtet, das dem von Myr5 ähnelte. Die anschließend durchgeführte Doppeltransfektion mit Myr5 und dieser Mutante zeigte, dass die Rekrutierung dieser beiden Proteine einheitlich ist. Somit ist klar, dass die Rekrutierung von Myr5 unabhängig von der GAP-Aktivität erfolgt. Eine gemeinsame Rekrutierung von Myr5 und Rho und umgekehrt kann aber nicht sicher ausgeschlossen werden, weil die für die Untersuchungen verwendete Myr5-Mutante eventuell trotz inhibierter GAP-Aktivität noch an Rho binden konnte. Gegen eine gemeinsame Rekrutierung von Myr5 und Rho spricht jedoch die Beobachtung, dass Myr5 zwar mit RhoB und RhoC kolokalisiert, nicht jedoch mit RhoA. Da Myr5 über seine GAP-Domäne höchstwahrscheinlich sowohl RhoA als auch RhoB und RhoC binden kann, wäre bei einer gemeinsamen Rekrutierung der Rho-Isoformen und Myr5 über diese Bindung auch eine Kolokalisation von Myr5 und RhoA zu erwarten gewesen. Um eine gemeinsame Rekrutierung von Myr5 und Rho sicher auszuschließen, müssten Untersuchungen mit einer Myr5-Mutante, die nicht mehr an Rho binden kann, durchgeführt werden.

Zusammenfassend scheint es sicher zu sein, dass die Myr5-Rekrutierung in die bakterielle Invasionszone unabhängig von der Myosin-Funktion erfolgt. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Rekrutierung von Myr5 auch unabhängig von der GAP-Aktivität erfolgt, wobei ein gemeinsamer Transport von Myr5 und Rho nicht sicher ausgeschlossen werden konnte. Der genaue Rekrutierungsmechanismus konnte nicht aufgedeckt werden und bleibt somit unklar.

4.3. Untersuchungen zur funktionellen Rolle von Myr5 während der Epithelzellinvasion durch *Shigella flexneri*

Die Myosine werden zurzeit in 18 Klassen eingeteilt. Das Myosin des Muskels wird als konventionelles Myosin bezeichnet und gehört der Myosinklasse II an. Die Myosine der anderen Klassen werden als nicht konventionelle Myosine bezeichnet. Für die nicht konventionellen Myosine wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl verschiedener Funktionen beschrieben, so z.B. eine Beteiligung bei der Zellbewegung, bei der Endo- und Exozytose, bei der Phagozytose, beim Intrazellulärtransport und bei der Signaltransduktion (65, 66, 67, 68).

Charakteristisch für die Myosine der Klasse IX ist die GAP-Domäne in der Schwanz-Region des Proteins. Es wurde gezeigt, dass Myr5 und das humane Myosin-IXb aus der Myosinklasse IX mittels dieser GAP-Domäne *in vitro* spezifisch GTPasen der Rho-Gruppe, die eine große Bedeutung bei der Regulation des Zytoskelettes besitzen (95, 99, 101), von einem GTP-gebundenen, aktiven Zustand in einen GDP-gebundenen, inaktiven Zustand überführen (63, 71). Dabei stellte sich heraus, dass Myr5 *in vitro* Rho zu 95%, CDC42 zu 90% und Rac zu 70% inaktivieren kann (63, 100). Dass Myr5 Rho auch *in vivo* inaktivieren kann, zeigten die Untersuchungen, bei denen HeLa-Zellen mit Myr5 transfiziert wurden. Dabei wurde beobachtet, dass Myr5 bei einer Überexpression die Bildung von Stressfasern inhibierte. Da Stressfasern u.a. die Integrität der Zelle gewährleisten, führte die verminderte Bildung der Stressfasern zu abnormen Veränderungen der Zellmorphologie, so dass die HeLa-Zellen ein Neuron-ähnliches Aussehen zeigten (siehe 3.1.). Da die Bildung von Stressfasern Rho-abhängig ist (54), scheint es sehr wahrscheinlich, dass Myr5 diese verminderte Bildung der Stressfasern über eine Inaktivierung von Rho bewirkte. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, dass bei Zellen, die mit dem Rho-spezifischen Inhibitor *Clostridium botulinum* Exoenzym C3 behandelt wurden, die gleichen Effekte wie bei der Überexpression von Myr5 beobachtet wurden (60). Der Tatsache, dass Myr5 somit Rho auch *in vivo* inaktivieren kann, liegt die Vermutung nahe, dass Myr5 bei der Signaltransduktion als physiologischer Regulator für GTPasen der Rho-Gruppe von Bedeutung ist.

Rho ist essentiell für die Epithelzellinvasion durch *Shigella flexneri* (37). Dies zeigte sich dadurch, dass bei HeLa-Zellen, die mit dem Rho-spezifischen Inhibitor *Clostridium botulinum* Exoenzym C3 behandelt wurden (60), eine 87%ige Inhibition der Shigelleninvasion nachgewiesen wurde (37). Während der Invasion stabilisiert und bündelt Rho *Shigellen*-induziert filamentäres Aktin, das an der bakteriellen Eintrittsstelle aus monomerem Aktin (G-Aktin) polymerisiert. Dies wiederum führt zur Bildung von Membranausstülpungen um das Bakterium herum und schließlich zur Aufnahme des Bakteriums (9). Nach der Bakterienaufnahme depolymerisiert das filamentäre Aktin wieder zu monomerem Aktin (40). Es ist vorstellbar, dass *Shigella* auch die Aktindepolymerisation induziert, damit genügend monomeres Aktin für die IcsA-abhängige, intra- und interzelluläre Bewegung von *Shigella*, die essentiell für die Pathogenität ist (35, 38), zur Verfügung steht. So liegt die Vermutung nahe, dass es einen Mechanismus gibt, über den Rho nach der Bakterienaufnahme inaktiviert und dadurch eine überschüssige Aktinreorganisation verhindert wird. Da Myr5 während der Shigelleninvasion mit RhoB und RhoC kolokalisiert

und die Tatsache, dass Myr5 Rho *in vivo* inaktivieren kann, führten zu der Hypothese, dass Myr5 nach der Bakterienaufnahme, eventuell *Shigellen*-induziert, Rho inaktiviert, dadurch die *Shigellen*-induzierte Aktinreorganisation inhibiert und somit die anschließende Aktin-depolymerisation initiiert.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden HeLa-Zellen mit Myr5 transfiziert und anschließend Invasionsexperimente mit *Shigella flexneri* durchgeführt, bei denen die Infektionseffizienz abhängig vom Expressionsniveau von Myr5 bestimmt wurde. Dabei konnte festgestellt werden, dass Myr5 die Infektion durch *Shigella* abhängig vom Expressionsniveau inhibierte. Je stärker die Expression von Myr5 war, desto höher war die Inhibition der Infektion (siehe 3.7.). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass Myr5 über eine Inaktivierung von Rho dessen Aktin-stabilisierende Wirkung und dadurch die *Shigellen*invasion inhibierte. Dieses Ergebnis liefert zum einen weiteren Beleg dafür, dass Myr5 Rho auch *in vivo* inaktivieren kann und stützt zum anderen die Vermutung, dass Myr5 nach der *Shigellen*invasion als Inaktivator von Rho fungieren könnte.

Es ist interessant, dass Myr5 Rho *in vitro* nur zu ca. 95% inaktiviert (63), die *Shigellen*infektion bei starker Expression aber vollständig inhibiert. Die einfachste Erklärung dieses Phänomens ist die Annahme, dass Rho durch Myr5 zwar nicht 100%ig inaktiviert wird, der verbleibende, aktive Anteil an Rho aber nicht mehr für eine Invasion von *Shigella flexneri* ausreicht. Doch Myr5 besitzt *in vitro* auch eine inaktivierende Wirkung auf die GTPasen CDC42 und Rac (63), die ebenfalls an der Organisation des Zytoskelettes beteiligt sind (95, 99, 101) und für die kürzlich eine Beteiligung bei der Epithelzellinvasion durch *Salmonella typhimurium* gezeigt werden konnte (3). Daher muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass diese vollständige Inhibition der Infektion durch Myr5 nicht auf eine alleinige Inaktivierung von Rho zurückzuführen ist, sondern möglicherweise erst durch eine gemeinsame Inaktivierung von Rho, CDC42 und Rac erreicht wird. Diese Vermutung liegt insbesondere nahe, da kürzlich gewonnene Daten zeigen, dass auch CDC42 und Rac während der *Shigellen*infektion in der Invasionszone mit F-Aktin kolokalisieren und für die Invasion von *Shigella* funktionell von Bedeutung sind (53, 102).

Gestützt wird diese Spekulation des Weiteren dadurch, dass bei HeLa-Zellen die mit dem *Clostridium botulinum* Exoenzym C3 bzw. dem *Clostridium difficile* toxin B behandelt wurden, eine unterschiedlich starke Inhibition der *Shigellen*invasion beobachtet werden konnte. Das *Clostridium botulinum* Exoenzym C3 ist eine Glukosyltransferase und hemmt spezifisch Rho und besitzt keine Wirkung auf CDC42 und Rac (60). Es bewirkt eine ADP-

Ribosylierung von allen Rho-Isoformen (60). Dabei wird weder die GTPase-Aktivität von Rho noch die Bindung von GAP-Proteinen und Rho-GDI, einem Protein, das der Aktivierung von Rho entgegenwirkt (62), behindert. Vielmehr hemmt das Exoenzym C3 die Interaktion zwischen Rho und seinen Reaktionspartnern in der Form, dass ADP-ribosyliertes, inaktives Rho kompetitiv als Antagonist zu aktivem, GTP-gebundenem Rho wirkt (60). Das *Clostridium difficile* toxin B ist ebenfalls eine Glukosyltransferase (103). Es besitzt im Gegensatz zum *Clostridium botulinum* Exoenzym C3, das spezifisch Rho inhibiert (60), eine hemmende Wirkung sowohl auf Rho als auch auf CDC42 und Rac (103, 104). Bei einer alleinigen Inaktivierung von Rho durch das *Clostridium botulinum* Exoenzym C3 zeigte sich eine Inhibition der Bakterieninvasion von 87%. Bei einer gemeinsamen Inaktivierung von Rho, CDC42 und Rac durch das *Clostridium difficile* toxin B konnte hingegen eine 99,99%ige Invasionsinhibition beobachtet werden (37). Da bei einer zusätzlichen Inaktivierung von CDC42 und Rac eine höhere Invasionsinhibition als bei einer alleinigen Inaktivierung von Rho erreicht wurde, stützen diese Ergebnisse die gezeigte Involvierung von CDC42 und Rac während des Invasionsprozesses von *Shigella*. Gegen die Spekulation, dass Myr5 durch eine gemeinsame Inaktivierung von Rho, CDC42 und Rac die 100%ige Invasionsinhibition bewirkt, sprechen allerdings unlängst publizierte Ergebnisse, die verdeutlichen, dass Myr5 *in vitro* zwar alle drei Proteine inhibiert, *in vivo* jedoch nur einen starken Effekt auf Rho besitzt und nur sehr geringe Wirkung auf CDC42 und Rac zeigt (73). Des Weiteren unterscheiden sich die Rekrutierungsmuster von Myr5 und Rac, und auch CDC42 wird nur in geringem Maße in die zellulären Protrusionen rekrutiert (100), so daß auch aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation der Proteine während des Invasionsprozesses eine Inaktivierung von CDC42 und Rac durch Myr5 unwahrscheinlich ist.

Die quantitativen Invasionsexperimente mit Myr5 zeigten, dass Myr5 expressionsabhängig die Shigelleninvasion in HeLa-Zellen inhibiert. Die wahrscheinlichste Erklärung dieses Ergebnisses ist die Hypothese, dass Myr5 über eine Inaktivierung von Rho dessen Aktinstabilisierende Wirkung und dadurch die Shigelleninvasion inhibiert. Nun wurden quantitative Invasionsexperimente mit einer GAP-negativen Myr5-Mutante, deren Rekrutierungsmuster dem von Myr5 entsprach (siehe 3.6.), durchgeführt. Diese Kontrolluntersuchung hatte zwei wesentliche Gründe. Zum einen wurde mit diesen Experimenten untersucht, ob die beobachtete Invasionsinhibition durch Myr5 die Folge einer durch die Aufnahme fremder DNA bedingten gestörten Stoffwechsellage der Zellen war. Zum anderen lieferten diese quantitativen Invasionsexperimente mit der GAP-negativen Mutante eine Kontrolle dafür, ob

die Invasionsinhibition durch Myr5 tatsächlich auf dessen GAP-Aktivität zurückzuführen ist. Das Ergebnis war sehr interessant. So bewirkte Myr5-GAP⁻ im Gegensatz zu Myr5 keine Inhibition der Shigelleninvasion. Das Gegenteil war der Fall. Myr5-GAP⁻ förderte die Invasion von *Shigella* in HeLa-Zellen (siehe 3.8.). Dabei machte es den Eindruck, als ob die Invasionseffizienz der *Shigellen* umso größer wurde, desto stärker die Expression von Myr5-GAP⁻ war (siehe Abb. 20). Diese Daten lassen zwei wesentliche Aussagen zu.

1. Die Inhibition der Shigelleninvasion durch Myr5 war kein Nebeneffekt der Transfektion.

Da eine Transfektion eine starke Belastung für die Zelle darstellt, musste die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die bei den mit Myr5 transfizierten Zellen beobachtete Invasionsinhibition allein durch die Aufnahme von freier DNA und den damit verbundenen Störungen des Zellstoffwechsels bedingt wurde. Da bei einer Transfektion mit Myr5-GAP⁻, was für die Zellen eine identische Belastung wie die Transfektion mit Myr5 darstellte, keine Invasionsinhibition festgestellt wurde, kann die Invasionsinhibition durch Myr5 somit nicht als Artefakt des Transfektionsereignisses selbst gedeutet werden.

2. Die Inhibition der Shigelleninvasion durch Myr5 ist auf die GAP-Aktivität von Myr5 zurückzuführen. Die GAP-negative Mutante unterscheidet sich von Myr5 lediglich durch den Austausch einer Aminosäure und dem damit verbundenen Verlust der GAP-Aktivität. Eine Überexpression der GAP-inaktiven Mutante führte im Gegensatz zur Überexpression von GAP-aktivem Myr5 nicht zu einer Invasionsinhibition. Das beweist, dass die GAP-Aktivität von Myr5 für die Inhibition der Shigelleninvasion verantwortlich ist.

Diese Erkenntnisse sind ein klarer Beleg dafür, dass Myr5 bei Überexpression mittels seiner GAP-Aktivität eine Inaktivierung von Rho und dadurch eine Inhibition der Shigelleninvasion bewirkt. Dies wiederum erhärtet die Annahme, dass Myr5 nach der Bakterienaufnahme als Inaktivator von Rho fungieren könnte.

Die Ergebnisse der quantitativen Invasionsexperimente mit der GAP-negativen Mutante warfen auch die Frage auf, warum Myr5-GAP⁻ die Invasion von *Shigella* förderte. In diesem Zusammenhang kam der Gedanke auf, dass die Myosin-Funktion von Myr5 ebenfalls von Bedeutung sein könnte und Myr5 somit vielleicht zwei verschiedene, antagonistische Funktionen während der Shigelleninvasion besitzt. So kann spekuliert werden, dass Myr5 in einer frühen Phase der Invasion mittels der Myosin-Funktion möglicherweise ebenfalls Aktin-

stabilisierend wirkt und/oder die Aktinfilamente der Protrusionen in der Zellmembran “verankert“ und dadurch die Invasion fördert. Nach der Bakterienaufnahme könnte dann ein zweites bakterielles Signal zur Aktivierung der GAP-Funktion von Myr5 führen und dadurch eine Rho-Inaktivierung induzieren. Da bei der GAP-negativen Myr5-Mutante lediglich die Myosin-Funktion aktiv ist, könnte diese Hypothese somit die beobachtete Invasionssteigerung durch die Überexpression von Myr5-GAP⁻ erklären.

Weitere Überlegungen, die Förderung der Invasion durch Myr5-GAP⁻ zu deuten, zielen darauf, die Invasionssteigerung durch eine verminderte Rho-Inaktivierung und eine damit verbundene, effektivere Aktinstabilisierung und -bündelung zu erklären. So ist es vorstellbar, dass Myr5-GAP⁻ die Bindung eines humanen, aktiven Klasse-IX-Myosins, z.B. des Myosin-IXb, das kürzlich in HeLa-Zellen nachgewiesen werden konnte (AG Bähler, unveröffentlichte Daten), an Rho kompetitiv inhibiert. Da GAP-negatives Myr5 nicht in der Lage ist, Rho zu inaktivieren, stünde somit effektiv mehr GTP-gebundenes, aktives Rho zur Verfügung. Dadurch könnte eine effektivere, Rho-getriggerte Aktinreorganisation eventuell diese erhöhte Invasivität der *Shigellen* erklären. Diese Überlegungen setzen allerdings die Annahme voraus, dass die GAP-negative Mutante trotz inhibierter GAP-Aktivität noch an Rho binden konnte. Auf dieser Annahme beruht auch ein weiteres Modell, das die Förderung der Shigelleninvasion durch Myr5-GAP⁻ erklären könnte. Diesem Modell liegt die Vermutung zu Grunde, dass Rho möglicherweise über die Bindung an Myr5 im Bereich der GAP-Domäne gemeinsam mit diesem in die bakterielle Invasionszone rekrutiert wird. Bei den mit der GAP-negativen Mutante transfizierten Zellen würde somit nicht nur vermehrt das GAP-negative Myr5, sondern auch das daran gebundene Rho vermehrt in der Invasionszone akkumulieren. Die daraus resultierende erhöhte Konzentration von Rho an der bakteriellen Eintrittsstelle könnte somit die gesteigerte Invasion der *Shigellen* erklären.

Weiterhin ist denkbar, dass es für Myr5 einen spezifischen Rekrutierungsmechanismus gibt. Ein spezifischer Mechanismus konnte zwar nicht aufgedeckt werden (siehe 4.2.), aber es ist nicht ausgeschlossen, dass das humane Myosin-IXb und die GAP-negative Mutante um einen solchen möglichen Rekrutierungsmechanismus konkurrieren. Die Überexpression der GAP-negativen Mutante in den transfizierten Zellen könnte somit einen verminderten Transport des physiologischen, aktiven Klasse-IX-Myosins in die Invasionszone zur Folge haben. Dies wiederum würde eine verminderte Inaktivierung von Rho und dadurch eine verstärkte Aktinstabilisierung nach sich ziehen, was die erhöhte Invasivität der *Shigellen* verständlich machen würde.

Zusammenfassend lassen sich unsere Ergebnisse wie folgt interpretieren. Eine Überexpression von Myr5 führt zu einer Verminderung der Infektionseffizienz. Dabei inaktiviert Myr5 mittels seiner GAP-Funktion vermehrt Rho und inhibiert dadurch dessen für die Shigelleninvasion essentielle, Aktin-stabilisierende Wirkung. Im Gegensatz dazu führt eine Überexpression von Myr5-GAP⁻ zu einer Erhöhung der Infektionseffizienz, was darauf hindeutet, dass neben der GAP-Funktion auch die Myosin-Funktion von Myr5 funktionell von Bedeutung ist. Möglicherweise besitzt Myr5 somit während der Epithelzellinvasion von *Shigella flexneri* zweizeitig verschiedene, antagonistische Funktionen. Im Modell zur Shigelleninvasion könnte Myr5 zunächst mittels seiner Myosin-Funktion Aktin-stabilisierend und somit invasionsfördernd wirken. Zu einem späteren Zeitpunkt inaktiviert Myr5 mittels der GAP-Funktion die GTPase Rho und inhibiert dadurch dessen Aktin-stabilisierende Wirkung. Somit würde Myr5 in diesem Modell dann antagonistisch zur *Shigellen*-induzierten Aktinreorganisation wirken und könnte damit die Rückbildung der zur Invasion nötigen Zytoskelettveränderungen initiieren.

Da durch die Unterbindung einer überschüssigen Aktinpolymerisation auch der intrazelluläre Pool an G-Aktin erhöht und somit gesichert wird, dass den *Shigellen* genügend monomeres Aktin für die IcsA-abhängige, intra- und interzelluläre Bewegung, die für die Pathogenität von *Shigella* essentiell ist (34, 35, 38), zur Verfügung steht, könnte die Aktivierung der GAP-Funktion von Myr5 ebenfalls *Shigellen*-induziert sein.

Weiterhin zeigten unsere Untersuchungen, dass Myr5 nur mit den Rho-Isoformen RhoB und RhoC in den Spitzen der zellulären Protrusionen kolokalisiert und daher sehr wahrscheinlich, nur diese Rho-Isoformen nach der Invasion von *Shigella* inaktiviert. Da Myr5 in vitro jedoch auf alle 3 Rho-Isoformen eine inaktivierende Wirkung besitzt, scheinen somit im Modell zur Epithelzellinvasion von *Shigella* RhoB und RhoC allein durch ihr Rekrutierungsverhalten, Isoformen-spezifisch von Myr5 inaktiviert zu werden. Somit zeigen unsere Kolokalisationsexperimente im Gegensatz zu biochemischen in vitro Untersuchungen, die eine Interaktion zwischen Myr5 und RhoA zeigten, dass eine tatsächliche in vivo Interaktion voraussetzt, dass sich die Interaktionspartner zu einem gegebenen Zeitpunkt am gleichen Ort befinden müssen (Kolokalisation).

Die unterschiedlichen Rekrutierungsmuster von Myr5 und RhoA führen zu der Annahme, dass es für RhoA, das vermehrt in den zellnäheren Abschnitten der Membranstruktur um das Bakterium herum akkumuliert, einen anderen, Myr5-unabhängigen Mechanismus zur Inaktivierung geben könnte.

Naheliegender ist die Vermutung, dass RhoA durch ein anderes GAP-Protein inaktiviert wird.

So besitzen u.a. die Proteine p190, Bcr und p122 eine GAP-Aktivität für RhoA (105, 106). Des Weiteren gibt es experimentelle Daten, die darauf hindeuten, dass insbesondere das GAP-Protein p190 als Inaktivator von RhoA in Frage kommt. So kann p190 zum einen RhoA inaktivieren, zum anderen wird die Aktivität von p190 durch die Tyrosinkinase pp60c-src reguliert (107, 108). Nun ist es höchst interessant, dass diese Tyrosinkinase in die bakterielle Invasionszone rekrutiert wird und dabei das Rekrutierungsmuster von pp60c-src dem von RhoA ähnelt (109). Diese Beobachtungen lassen die Aufstellung eines hypothetischen Modells zu, bei dem eine Signalkaskade die RhoA-Inaktivierung steuert. So könnte pp60c-src *Shigellen*-induziert das GAP-Protein p190 aktivieren und dadurch zur Inaktivierung von RhoA führen.

In diesem Zusammenhang muß auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß RhoA nicht spezifisch inaktiviert wird, sondern dessen Wirkung durch einen anderen Mechanismus antagonisiert wird. So wurde von Bourdet-Sicard et al. gezeigt, daß IpaA an Vinculin, ein Aktin-bindendes Protein (110, 111), dem u.a. Bedeutung bei der Verankerung von F-Aktin an der Zellmembran zugeschrieben wird (112), binden kann und dadurch eine vermehrte Bindung von Vinculin an F-Aktin bewirkt. Dies wiederum führt zu einer vermehrten Depolarisation von F-Aktin (50). Diese Kausalkette ist insbesondere von Bedeutung, wenn man die Tatsache hinzuzieht, daß IpaA-negative *Shigellen*mutanten ungeordnet wirkende, zelluläre Membranausstülpungen initiieren, die offenbar eine Hemmung der Aktin-polymerisation im Bereich der bakteriozellulären Kontaktzone und dadurch die Bildung der typischen, blütenartigen Membranstruktur um die Bakterien herum vermissen lassen (45). Somit kann die Hypothese aufgestellt werden, daß IpaA insbesondere unterhalb der bakteriozellulären Kontaktzone, in der auch RhoA akkumuliert und F-Aktin bündelt und stabilisiert, zu einer Vinculinaktivierung und damit vermehrten Aktindepolymerisation führt, so daß es keiner spezifischen RhoA-Inaktivierung bedarf.

Im Zuge dieser Spekulationen zum Inaktivierungsmechanismus von Rho muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Rho-Aktivität während der Invasion von *Shigella* nicht über GAP-Proteine, wie z.B. Myr5, reguliert wird, sondern über eine Aktivierung bzw. Inaktivierung von GEF-Proteinen (GDP/GTP exchange factor). GEF-Proteine überführen Rho von einem GDP-gebundenen, inaktiven Zustand in einen GTP-gebundenen, aktiven Zustand und wirken somit antagonistisch zu GAP-Proteinen (113, 114). Es ist vorstellbar, dass ein *Shigellen*-induziertes Signal zur Aktivierung der GEF-Proteine führt und dadurch die Rho-getriggerte Aktinreorganisation initiiert. Nach der

Bakterienaufnahme könnte ein zweites bakteriell-induziertes Signal eine Inaktivierung der GEF-Proteine bewirken und dadurch Rho inhibieren.

Fest steht, dass die Aktin-stabilisierende Wirkung von Rho essentiell für die Epithelzellinvasion von *Shigella flexneri* ist. Dabei kommt der Regulation der Rho-Aktivität durch das Bakterium eine zentrale Rolle zu. Diese Regulation der Rho-Aktivität während der Epithelzellinvasion ist ein hochspezifischer Prozess, der durch *Shigella* gesteuert wird und höchstwahrscheinlich auf einer gezielten Induktion von Rho-Aktivatoren und Rho-Inaktivatoren basiert. Wie dabei *Shigellen*-induziert die Rho-Aktivierung erfolgt, ist bisher ungeklärt. Ein Modell zum Mechanismus der Rho-Inaktivierung konnte im Rahmen dieser Arbeit entwickelt werden. Dabei fungiert ein GAP-Protein der Myosinklasse IX, das in den Epithelzellen des humanen Gastrointestinaltraktes das Myosin-IXb sein könnte, als Inaktivator der Rho-Isoformen RhoB und RhoC. Außerdem schlägt dieses Modell das GAP-Protein p190 als Inaktivator von RhoA vor. Myr5 interagiert während der Shigelleninvasion nicht mit RhoA. Da Myr5 in vitro mit allen 3 Rho-Isoformen interagiert, bei unseren in vivo Experimenten jedoch nur mit RhoB und RhoC, scheint die tatsächliche in vivo Interaktion über das unterschiedliche Rekrutierungsverhalten gesteuert zu werden.

Während der Epithelzellinvasion greift *Shigella* in physiologische Prozesse der Wirtszelle ein und macht sich diese zunutze. Die hier beschriebene mögliche Inaktivierung von Rho durch Myr5 mag dafür ein Beispiel sein. Wie *Shigella* dabei gezielt zelluläre Moleküle aktiviert bzw. inaktiviert und dadurch physiologische Reaktionskaskaden induziert, ist bisher nur teilweise verstanden. Die Aufklärung dieser Mechanismen wird ein weiterer wesentlicher Schritt sein, um die Pathogenitätsmechanismen virulenter Bakterien zu verstehen.

5. Zusammenfassung

Shigellen sind die Erreger der bakteriellen Ruhr beim Menschen. Diese Erkrankung entspricht einer Kolitis und wird im Wesentlichen durch die häufigen, stark wässrigen Stuhlentleerungen, die Schleim- und Blutbeimengungen enthalten können, und die dadurch hervorgerufenen Symptome des starken Flüssigkeitsverlustes charakterisiert.

Ein wesentlicher Virulenzfaktor der *Shigellen* ist die Fähigkeit, in die Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes einzudringen. Dabei induziert *Shigella* in der Epithelzelle Zytoskelettarrangements, die zur Ausbildung einer blütenartigen Membranstruktur um das Bakterium herum führen. Die Zytoplasmamembran konfluiert schließlich über dem Bakterium und internalisiert es. Dieser Vorgang ist Rho-abhängig. Diese kleine GTPase ist essentiell für die Shigelleninvasion und wird während der Invasion an die bakterielle Eintrittsstelle rekrutiert. Dabei akkumuliert RhoA direkt an der bakteriozellulären Kontaktzone, wohingegen die Isoformen RhoB und RhoC in die zellulären Protrusionen rekrutiert werden. In der Invasionszone stabilisiert und bündelt Rho filamentäres Aktin. Eine Inhibition der GTPase Rho mit dem Rho-spezifischen Inhibitor C3 verhindert die bakterielle Invasion.

Myr5, ein atypisches Myosin der Klasse IX, ist das erste beschriebene Myosin mit einem GAP-Modul. Mit dieser Regulationsfunktion kann Myr5 Rho inaktivieren. So führt eine Überexpression von Myr5 zu Zytoskelettveränderungen, die von denen des Rho-spezifischen Inhibitors C3 nicht unterscheidbar sind. Zum Studium einer potentiellen Rolle des Rho-Antagonisten Myr5 für die Epithelzellinvasion durch *Shigella flexneri* wurden HA- und VSV-getagte Myr5-Konstrukte in einer humanen Epithelzelllinie transient zur Expression gebracht. Dabei zeigte sich, dass Myr5 bei der Shigelleninvasion in die zellulären Protrusionen rekrutiert wird. Dort kolokalisiert Myr5 mit F-Aktin und RhoB/C, nicht jedoch mit RhoA. Um den Rekrutierungsmechanismus zu untersuchen, wurden Experimente mit Myr5-Konstrukten, die hinsichtlich der GAP-Funktion bzw. der ATPase-Funktion oder ATP-Bindungsstelle mutiert waren, durchgeführt. Diese Myr5-Mutanten wurden ebenfalls *Shigellen*-induziert in die Invasionszone rekrutiert. In doppeltransfizierten Zellen zeigten Myr5 und diese Mutanten identische Rekrutierungsmuster. Dies deutet darauf hin, dass die Rekrutierung von Myr5 in die bakterielle Invasionszone unabhängig von der GAP- und der Myosin-Funktion erfolgt.

Mit quantitativen Invasionsexperimenten wurde eine Beeinflussung der bakteriellen Invasion durch Myr5 untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass Myr5 in Abhängigkeit von der

Expressionseffizienz die Empfänglichkeit der Zellen für eine Infektion mit *Shigella* vermindert. Eine starke Überexpression von Myr5 führt zu einer kompletten Invasionsinhibition. Dabei inaktiviert Myr5 mittels seiner GAP-Funktion vermehrt Rho und inhibiert dadurch dessen für die Shigelleninvasion essentielle, Aktin-stabilisierende Wirkung. Im Gegensatz dazu erhöht eine GAP-negative Myr5-Mutante expressionsabhängig die bakterielle Infektionseffizienz. Dies lässt den Schluss zu, dass neben der GAP-Funktion auch die Myosin-Funktion von Myr5 während des Invasionsprozesses funktionell von Bedeutung ist.

Somit besitzt Myr5 während der Epithelzellinvasion von *Shigella flexneri* möglicherweise zweizeitig verschiedene, antagonistische Funktionen. Im Modell zur Shigelleninvasion könnte Myr5 zunächst mittels seiner Myosin-Funktion Aktin-stabilisierend und somit invasionsfördernd wirken. Zu einem späteren Zeitpunkt inaktiviert Myr5 mittels der GAP-Funktion die GTPase Rho und inhibiert dadurch dessen Aktin-stabilisierende Wirkung. Somit würde Myr5 dann antagonistisch zur *Shigellen*-induzierten Aktinreorganisation wirken und könnte damit die Rückbildung der zur Invasion nötigen Zytoskelettveränderungen initiieren.

Aufgrund der Tatsache, dass Myr5 nur mit den Rho-Isoformen RhoB und RhoC in den Spitzen der zellulären Protrusionen kolokalisiert ist es sehr wahrscheinlich, dass Myr5 nur diese Rho-Isoformen nach der Invasion von *Shigella* inaktiviert. Da Myr5 in vitro jedoch auf alle 3 Rho-Isoformen eine inaktivierende Wirkung besitzt, scheinen somit im Modell zur Epithelzellinvasion von *Shigella* RhoB und RhoC allein durch ihr Rekrutierungsverhalten, Isoformen-spezifisch von Myr5 inaktiviert zu werden.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Sansonetti, P.J. 1991. Genetic and molecular basis of epithelial cell invasion by *Shigella* species. *Rev. Infect. Dis.* 13: 285-292
- (2) Ginocchio, C.C., Olmsted, S.B., Wells, C.L., Galan, J.E. 1994. Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell* 76: 717-724
- (3) Hardt, W.D., Chen, L.M., Schuebel, K.E., Bustelo, X.R., Galan, J.E. 1998. *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 93: 815-826
- (4) Falkow, S., Isberg, R.R., Portnoy, D.A. 1992. The interaction of bacteria with mammalian cells. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8: 333-363
- (5) Finlay, B.B., Falkow, S. 1989. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev.* 53: 476-511
- (6) Sanders, M.C., Theriot, J.A. 1996. Tails from the hall of infection: actin-based motility of pathogens. *Trends Microbiol.* 4: 211-213
- (7) Winkler, H.H. 1990. *Rickettsia* species (as organism). *Annu. Rev. Microbiol.* 44: 131-133
- (8) Gailard, J.L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S., Sansonetti, P. 1987. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte cell line Caco2. *Infect. Immun.* 55: 2822-2829
- (9) Menard, R., Dehio, C., Sansonetti, P.J. 1996. Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella*. *Trends Microbiol.* 4: 220-226
- (10) High, N., Mounier, J., Prevost, M.C., Sansonetti, P.J. 1992. IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *EMBO J.* 11: 1991-1999
- (11) Loisel, T.P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., Carlier, M.F. 1999. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 401: 613-616
- (12) Cossart, P., Lecuit, M. 1998. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* 17: 3797-3806

- (13) Niebuhr, K. 1994. Untersuchungen zu Pathogenitätsmechanismen von *Listeria monocytogenes*: Charakterisierung des bakteriellen Virulenzfaktors ActA. Dissertation, TU Braunschweig
- (14) Egile, C., Loisel, T.P., Laurent, V., Pantaloni, D., Sansonetti, P.J., Carlier, M.F. 1999. Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J. Cell Biol.* 146: 1319-1332
- (15) Collier, L., Balows, A., Sussman, M. 1998. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections / ninth edition, volume 2, systemic bacteriology. Oxford University Press, Inc., New York: 943-945
- (16) Pupo, G.M., Karaolis, D.K., Lan, R., Reeves, P.R. 1997. Evolutionary relationship among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. *Infect.Immun.* 65: 2685-2692
- (17) Pupo, G.M., Lan, R., Reeves, P.R. 2000. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 97: 10567-10572
- (18) Rolland, K., Lambert, Zechovsky, N., Picard, B., Denamur, E. 1998. *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* strains are derived from distinct ancestral strains of *E.coli*. *Microbiology* 144: 2667-2672
- (19) Hornick, R.B. 1978. Bacterial infections of the intestine. aus: Weinstein, L., Fields, B.N. Seminars in infectious disease, chap 3. Stratton Intercontinental Medical, New York: 68-96
- (20) Brandis, H., Eggers, H.J., Köhler, W., Pulverer, G. 1994. Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, 7. Auflage. Gustav Fischer Verlag · Stuttgart · Jena · New York: 404-408
- (21) Perdomo, J.J., Cavaillon, J.M., Huerre, M., Ohayon, H., Gounon, P., Sansonetti, P.J. 1994. Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis. *J. Exp. Med.* 180: 1307-1319
- (22) Clerc, P., Sansonetti, P.J. 1987. Entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells: evidence for directed phagocytosis involving actin polymerization and myosin accumulation. *Infect. Immun.* 55: 2681-2688
- (23) Neutra, M.R., Frey, A., Kraehenbuhl, J.P. 1996. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 86: 345-348

- (24) Zychlinsky, A., Prevost, M.C., Sansonetti, P.J. 1992. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 358: 167-169
- (25) Zychlinsky, A., Fitting, C., Cavaillon, J.M., Sansonetti, P.J. 1994. Interleukin 1 is released by murine macrophages during apoptosis induced by *Shigella flexneri*. *J. Clin. Invest.* 94: 1328-1332
- (26) Sansonetti, P.J., Arondel, J., Cavaillon, J.M., Huerre, M. 1995. Role of interleukin-1 in the pathogenesis of experimental shigellosis. *J. Clin. Invest.* 96: 884-892
- (27) Mounier, J., Vasselon, T., Hellio, R., Lesourd, M., Sansonetti, P.J. 1992. *Shigella flexneri* enters human colonic Caco-2 epithelial cells through the basolateral pole. *Infect. Immun.* 60: 237-248
- (28) Perdomo, J.J., Gounon, P., Sansonetti, P.J. 1994. Polymorphonuclear leucocyte transmigration promotes invasion of colonic epithelial monolayers by *Shigella flexneri*. *J. Clin. Invest.* 93: 633-643
- (29) Beatty, W.L., Sansonetti, P.J. 1997. Role of lipopolysaccharide in signalling to subepithelial polymorphonuclear leucocytes. *Infect. Immun.* 65: 4395-4404
- (30) Goldberg, M.B., Sansonetti, P.J. 1993. *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. *Infect. Immun.* 61: 4941-4946
- (31) Allaoui, A., Mounier, J., Prevost, M.C., Sansonetti, P.J., Parsot, C. 1992. IcsB: a *Shigella flexneri* virulence gene necessary for the lysis of protrusions during intercellular spread. *Mol. Microbiol.* 6: 1605-1616
- (32) Goldberg, M.B., Bazu, O., Parsot, C., Sansonetti, P.J. 1993. Unipolar localization and ATPase activity of IcsA, a *Shigella flexneri* protein involved in intracellular movement. *J. Bacteriol.* 175: 2189-2196
- (33) Bernardini, M.L., Mounier, J., d'Hauteville, H., Coquis-Rondon, M., Sansonetti, P.J. 1989. Identification of icsA, a plasmid locus of *Shigella flexneri* which governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3867-3871
- (34) Sansonetti, P.J., Arondel, J., Fontaine, A., d'Hauteville, H., Bernardini, M.L. 1991. OmpB (osmo-regulation) and icsA (cell-to-cell-spread) mutants of *Shigella flexneri*: vaccine candidates and probes to study the pathogenesis of shigellosis. *Vaccine* 9: 416-422
- (35) Vasselon, T., Mounier, J., Prevost, M.C., Hellio, R., Sansonetti, P.J. 1991. Stress fiber-based movement of *Shigella flexneri* within cells. *Infect. Immun.* 59: 1723-1732

- (36) Vasselon, T., Mounier, J., Hellio, R., Sansonetti, P.J. 1992. Movement along actin filaments of the perijunctional area and de novo polymerization of cellular actin are required for *Shigella flexneri* colonization of epithelial Caco-2 cell monolayers. *Infect. Immun.* 60: 1031-1040
- (37) Adam, T., Giry, M., Boquet, P., Sansonetti, P. 1996. Rho-dependent membrane folding causes *Shigella* entry into epithelial cells. *EMBO J.* 15: 3315-3321
- (38) D'Hauteville, H., Lagelouse, R.D., Nato, F., Sansonetti, P.J. 1996. Lack of cleavage of IcsA in *Shigella flexneri* causes aberrant movement and allows demonstration of a cross-reactive eucaryotic protein. *Infect. Immun.* 64: 511-517
- (39) Labrec, E.H., Schneider, H., Magnani, T.J., Formal, S.B. 1964. Epithelial cell penetration as an essential step in the pathogenesis of bacillary dysentery. *J. Bact.* 88: 1503-1518
- (40) Sansonetti, P.J., Arondel, J., Cantey, J.R., Prevost, M.C., Huerre, M. 1996. Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri*: effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium. *Infect. Immun.* 64: 2752-2764
- (41) Adam, T., Arpin, M., Prevost, M.C., Gounon, P., Sansonetti, P.J. 1995. Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-Plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. *J. Cell Biol.* 129: 367-381
- (42) Watarai, M., Tobe, T., Yoshikawa, M., Sasakawa, C. 1995. Contact of *Shigella* with host cells triggers release of Ipa invasins and is an essential function of invasiveness. *EMBO J.* 14: 2461-2470
- (43) Barzu, S., Benjelloun-Touimi, Z., Phalipon, A., Sansonetti, P., Parsot, C. 1997. Functional analysis of the *Shigella flexneri* IpaC invasin by insertional mutagenesis. *Infect. Immun.* 65: 1599-1605
- (44) Menard, R., Prevost, M.C., Gounon, P., Sansonetti, P., Dehio, C. 1996. The secreted Ipa complex of *Shigella flexneri* promotes entry into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1254-1258
- (45) Tran Van Nhieu, G., Ben-Ze'ev, A., Sansonetti, P.J. 1997. Modulation of bacterial entry into epithelial cells by association between vinculin and the *Shigella* IpaA invasin. *EMBO J.* 16: 2717-2729
- (46) Menard, R., Sansonetti, P., Parsot, C. 1994. The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *EMBO J.* 13: 5293-5302

- (47) Menard, R., Sansonetti, P., Parsot, C., Vasselon, T. 1994. Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. *Cell* **79**: 515-525
- (48) Tran van Nhieu, G., Caron, E., Hall, A., Sansonetti, P.J. 1999. IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells. *Embo J.* **18**: 3249-3262
- (49) Mounier, J., Bahrani, F.K., Sansonetti, P.J. 1997. Secretion of *Shigella flexneri* Ipa invasins on contact with epithelial cells and subsequent entry of the bacterium into cells are growth stage dependent. *Infect. Immun.* **65**: 774-782
- (50) Bourdet-Sicard, R., Rüdiger, M., Jockusch, B.M., Gounon, P., Sansonetti, P.J., Tran Van Nhieu, G. 1999. Binding of the *Shigella* protein IpaA to vinculin induces F-actin depolymerization. *Embo J.* **18**: 5853-5862
- (51) Halle, T.L., Morris, R.E., Bonventre, P.F. 1979. *Shigella* infection of Henle intestinal epithelial cells: role of the host cell. *Infect. Immun.* **24**: 887-894
- (52) Skoudy, A., Tran Van Nhieu, G., Mantis, N., Arpin, M., Mounier, J., Gounon, P., Sansonetti, P. 1999. A functional role for ezrin during *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J. Cell Sci.* **112**: 2059-2068
- (53) Mounier, J., Laurent, V., Hall, A., Fort, P., Carlier, M.F., Sansonetti, P.J., Egile, C. 1999. Rho family GTPases control entry of *Shigella flexneri* into epithelial cells but not intracellular motility. *J. Cell Sci.* **112**: 2069-2080
- (54) Amano, M., Chihara, K., Kimura, K., Fukata, Y., Nakamura, N., Matsuura, Y., Kaibuchi, K. 1997. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* **275**: 1308-1311
- (55) Allen, W.E., Gareth, E.J., Jeffrey, W.P., Ridley, A.J. 1997. Rho, Rac and CDC42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *J. Cell Sci.* **110**: 707-720
- (56) Ridley, A.J., Hall, A. 1992. The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**: 389-399
- (57) Bowman, E.P., Uhlinger, D.J., Lambeth, J.D. 1993. Neutrophil phospholipase D is activated by a membrane-associated rho family small molecular weight GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* **268**: 24535-24538
- (58) Chong, L.D., Traynor-Kaplan, A., Bokoch, G.M., Schwartz, M.A. 1994. The small GTP-binding protein rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* **79**: 507-513

- (59) Watari, M., Kamata, Y., Kozaki, S., Sasakawa, C. 1997. Rho, a small GTP-binding protein, is essential for *Shigella* invasion of epithelial cells. *J. Exp. Med.* 185: 281-292
- (60) Narumiya, S., Morii, N. 1993. Rho gene products, botulinum C3 exoenzyme and cell adhesion. *Cell. Sign.* 5: 9-19
- (61) Machesky, L.M., Hall, A. 1997. Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J. Cell Biol.* 138: 913-926
- (62) Wu, W.J., Leonard, D.A., Cerione, A.R., Manor, D. 1997. Interaction between CDC42 and RhoGDI is mediated through the Rho insert region. *J. Biol. Chem.* 272: 26153-26158
- (63) Reinhard, J., Scheel, A.A., Diekmann, D., Hall, A., Ruppert, C., Bähler, M. 1995. A novel type of myosin implicated in signalling by Rho family GTPases. *EMBO J.* 14: 697-704
- (64) Thompson, R.F., Langford, G.M., 2002. Myosin superfamily evolutionary history. *Anat Rec* 268: 276-289
- (65) Mermall, V., Post, P.L., Mooseker, M.S. 1998. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* 279: 527-533
- (66) Hasson, T., Mooseker, S. 1995. Molecular motors, membrane movements and physiology: emerging roles for myosins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 587-594
- (67) Titus, M.A. 1997. Unconventional myosins: new frontiers in actin-based motors. *Trends Cell Biol.* 7: 119-123
- (68) Voigt, H., Olivo, J.C., Sansonetti, P., Guillen, N. 1999. Myosin IB from *Entamoeba histolytica* is involved in phagocytosis of human erythrocytes. *J. Cell Sci.* 112: 1191-1201
- (69) Self, T., Mahony, M., Fleming, J., Walsh, J., Brown, S.D.M., Steel, K.P. 1998. Shaker-1 mutations reveal roles for myosin VIIA in both development and function of cochlear hair cells. *Development* 125: 557-566
- (70) Wirth, J.A., Jensen, K.A., Post, P.L., Bement, W.M., Mooseker, M.S. 1996. Human myosin-IXb, an unconventional myosin with a chimerin-like rho/rac GTPase-activating protein domain in its tail. *J. Cell Sci.* 109: 653-661
- (71) Post, P.L., Bokoch, G.M., Mooseker, M.S. 1998. Human myosin-IXb is a mechanochemically active motor and a GAP for rho. *J. Cell Sci.* 111: 941-950
- (72) Chieriegatti, E., Gärtner, A., Stöffler, H.E., Bähler, M. 1998. Myr 7 is a novel myosin IX-RhoGAP expressed in rat brain. *J. Cell Sci.* 111: 3597-3608

- (73) Müller, R.T., Honnert, U., Reinhard, J., Bähler, M. 1997. The rat myosin myr 5 is a GTPase-activating protein for rho in vivo: essential role of arginine 1695. *Mol. Biol. Cell* 8: 2039-2053
- (74) Kreis, T.E. 1986. Microinjected antibodies against the cytoplasmic domain of vesicular stomatis virus glycoprotein block its transport to the cell surface. *EMBO J.* 5: 931-941
- (75) Maurelli, A.T., Baudry, B., d'Hauteville, H., Sansonetti, P.J. 1985. Cloning of plasmid DNA sequences involved in invasion of HeLa cells by *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* 49: 164-171
- (76) Sansonetti, P.J., Ryter, A., Clerc, P., Maurelli, A.T., Mounier, J. 1986. Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect. Immun.* 51: 461-469
- (77) Labigne-Roussel, A.F., Lark, D., Schoolnik, G., Falkow, S. 1984. Cloning and expression of an afimbrial adhesin (AFA-I) responsible for P blood group-independent, mannose-resistant hemagglutination from a pyelonephritic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* 46: 251-259
- (78) Hsu, S.H., Schacter, B.Z., Delaney, N.L., Miller, T.B., McKusick, V.A., Kennett, R.H., Bodmer, J.G., Young, D., Bodmer, W.F. 1976. Genetic characteristics of the HeLa cell. *Science* 191: 1966-1982
- (79) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 1994. *Molecular Biology of the cell / Third Edition*. Garland Publishing, Inc., New York-London: 847-858
- (80) Bejsovec, A., Anderson, P. 1990. Function of the myosin ATP and actin binding sites are required for *C. elegans* thick filament assembly. *Cell* 60: 133-140
- (81) Shimada, T., Sasaki, N., Ohkura, R., Sutoh, K. 1997. Alanine scanning mutagenesis of the switch I region in the ATPase site of Dictyostelium discoideum myosin II. *Biochemistry* 36: 14037-14043
- (82) Sansonetti, P.J. 1992. Molecular and cellular biology of *Shigella flexneri* invasiveness: from cell assay systems to shigellosis. *aus: Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol. 180*, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg: 1-18
- (83) Rousset, M. 1986. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie.* 68: 1035-1400

- (84) Mermall, V., McNally, J.G., Miller, K.G. 1994. Transport of cytoplasmic particles catalysed by an unconventional myosin in living *Drosophila* embryos. *Nature* **369**: 560-562
- (85) Govindan, B., Bowser, R., Novick, P. 1995. The role of Myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport. *J. Cell Biol.* **128**: 1055-1068
- (86) Tabb, J.S., Molyneaux, B.J., Cohen, D.L., Kuznetsov, S.A., Langford, G.M. 1998. Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V. *J. Cell Sci.* **111**: 3221-3234
- (87) Evans, L.L., Lee, A.J., Bridgman, P.C., Mooseker, M.S. 1998. Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport. *J. Cell Sci.* **111**: 2055-2066
- (88) Haarer, B.K., Petzold, A., Lillie, S.H., Brown, S.S. 1994. Identification of MYO4, a second class V myosin gene in yeast. *J. Cell Sci.* **107**: 1055-1064
- (89) Hasson, T.B., Mooseker, M.S. 1992. Two novel unconventional myosins identified from a kidney proximal tubule cell line. *Mol. Biol. Cell* **3**: 158
- (90) Hammer, J.A. III. 1994. The structure and function of unconventional myosins: a review. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **15**: 1-10
- (91) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 1994. *Molecular Biology of the cell / Third Edition*. Garland Publishing, Inc., New York-London: 834-847
- (92) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 1994. *Molecular biology of the cell / Third Edition*. Garland Publishing, Inc., New York-London: 813-814
- (93) Fath, K.R., Trimbur, G.M., Burgess, D.R. 1994. Molecular motors are differentially distributed on golgi membranes from polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* **126**: 661-675
- (94) Alcalde, J., Egea, G., Sandoval, I.V. 1994. gp74 a membrane glycoprotein of the cis-golgi network that cycles through the endoplasmic reticulum and intermediate compartment. *J. Cell Biol.* **124**: 649-665
- (95) Nobes, C.D., Hall, A. 1995. Rho, Rac and CDC42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia. *Cell* **81**: 53-62
- (96) Machesky, L., Hall, A. 1996. Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* **6**: 304-310

- (97) Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., Hall, A. 1992. The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor induced membrane ruffling. *Cell* 70: 401-410
- (98) Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., Lim, L. 1995. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* 15: 1942-1952
- (99) Hall, A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-514
- (100) Graf, B., Bähler, M., Hilpelä, P., Böwe, C., Adam, T. 2000. Functional role for the class IX myosin myr5 in epithelial cell infection by *Shigella flexneri*. *Cell. Microbiol.* 2: 601-616
- (101) Roux, P., Gauthier-Rouviere, C., Duocet-Brutin, S., Fort, P. 1997. The small GTPases Cdc42Hs, Rac1 and RhoG delineate Raf-independent pathways that cooperate to transform NIH3T3 cells. *Curr. Biol.* 7: 629-637
- (102) Dumenil, G., Sansonetti, P.J., Tran Van Nhieu, G. 2000. Src tyrosine kinase activity down-regulates rho-dependent responses during *Shigella* entry into epithelial cells and stress fibre formation. *J. Cell Sci.* 113: 71-80
- (103) Just, I., Selzer, J., Hofmann, F., Green, G.A., Aktories, K. 1996. Inactivation of Ras by *Clostridium sordellii* lethal toxin-catalyzed glucosylation. *J.Biol.Chem.* 271: 10149-10153
- (104) Genth, H., Hofmann, F., Selzer, J., Rex, G., Aktories, K., Just, I. 1996. Difference in protein substrate specificity between hemorrhagic toxin and lethal toxin from *Clostridium sordellii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229: 370-374
- (105) Zhang, B., Zheng, Y. 1998. Regulation of RhoA GTP hydrolysis by the GTPase-activating proteins p190, p50RhoGAP, Bcr and 3BP-1. *Biochemistry* 37: 5249-5257
- (106) Homma, Y., Emori, Y. 1995. A dual functional signal mediator showing RhoGAP and phospholipase C-delta stimulating activities. *EMBO J.* 14: 286-291
- (107) Chang, J.H., Gill, S., Settleman, J., Parsons, S.J. 1995. C-Src regulates the simultaneous rearrangement of actin cytoskeleton, p190RhoGAP and p120RasGAP following epidermal growth factor stimulation. *J. Cell Biol.* 130: 355-368
- (108) Fincham, V.J., Chudleigh, A., Frame, M.C. 1999. Regulation of p190 Rho-GAP by v-Src is linked to cytoskeletal disruption during transformation. *J. Cell Sci.* 112: 947-956

- (109) Dehio, C., Prevost, M.C., Sansonetti, P.J. 1995. Invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri* induces tyrosine phosphorylation of cortactin by a pp60c-src-mediated signalling pathway. *EMBO J.* 14: 2471-2482
- (110) Menkel, A.R., Kroemker, M., Bubeck, P., Ronsiek, M., Nikolai, G., Jockusch, B.M. 1994. Characterization of an F-actin-binding domain in the cytoskeletal protein vinculin. *J. Cell Biol.* 126: 1231-1240
- (111) Goldmann, W.H., Guttenberg, Z., Tang, J.X., Kroy, K., Isenberg, G., Ezzel, R.M. 1998. Analysis of the F-actin binding fragments of vinculin using stopped-flow and dynamic light-scattering measurements. *Eur. J. Biochem.* 254: 413-419
- (112) Gilmore, A.P., Burridge, K. 1996. Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate. *Nature* 381: 531-535
- (113) Sasaki, T., Takai, Y. 1998. The Rho small G protein family-Rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245: 641-645
- (114) Takai, Y., Kaibuchi, K., Sasaki, T., Tanaka, K., Shirataki, H., Nakanishi, H. 1994. Rho small G protein and cytoskeletal control. *Princess. Takamatsu. Symp.* 24: 338-350

Abkürzungsverzeichnis

>	-	kleiner als
<	-	größer als
%	-	Prozent
Abb.	-	Abbildung
ADP	-	Adenosindiphosphat
AS	-	Aminosäure
ATP	-	Adenosintriphosphat
bp	-	Basenpaare
BSA	-	bovines Serumalbumin
bzw.	-	beziehungsweise
°C	-	Grad Celsius
ca.	-	circa
DNA	-	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
Dr.	-	Doktor
<i>E. coli</i>	-	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	-	Ethylendiamintetraacetat
F-Aktin	-	filamentäres Aktin
FITC	-	Fluoresceinisoithiocyanat
FKS	-	fötales Kälberserum
fmol	-	Femtomol
g	-	Gramm
G-Aktin	-	globuläres Aktin
GAP-Protein	-	GTPase-activating protein
GDI-Protein	-	guanine nucleotide dissociation inhibitor
GDP	-	Guanosindiphosphat
GEF-Protein	-	GDP/GTP exchange factor
G-Protein	-	GTP-binding protein, GTPase
GTP	-	Guanosintriphosphat
HA-tag	-	Hämagglutinin-Epitop
HeLa	-	humane Zervixkarzinomzelllinie

IcsA	-	protein essential for intracellular Motility and intercellular spread
Ipa-Protein	-	invasion plasmid antigen protein
kb	-	Kilobasen
kDa	-	Kilodalton
LB	-	Luria Bertani broth, Medium
LPS	-	Lipopolysaccharid
M	-	molar
MEM	-	minimal essential medium with glutamine, Medium
mg	-	Milligramm
ml	-	Milliliter
mm	-	Millimeter
mM	-	millimolar
µg	-	Mikrogramm
µl	-	Mikroliter
µm	-	Mikrometer
µM	-	mikromolar
nm	-	Nanometer
o.a.	-	oben angeführt
[P]	-	Phosphatrest
p.a.	-	pro analysi
PBS	-	phosphate buffered saline, Phosphatpuffer
pIL-22	-	Plasmid IL-22
rpm	-	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	-	Raumtemperatur
TR	-	texas red
TSB	-	tryptic soy broth
u.a.	-	unter anderem
UV	-	ultraviolett
VSV-tag	-	vesicular stomatis virus glycoprotein-tag
x	-	mal
z.B.	-	zum Beispiel

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Christian Böwe
 Geburtsdatum: 22.09.1974
 Geburtsort: Parchim
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Eltern: Dietrich Böwe aus Reetz, Dipl.-Pädagoge für Sport / Geschichte
 Anneliese Böwe, geb. Schäffer, aus Ünze, Finanzbeamtin

Schulbildung: 09/1981 - 08/1991 Polytechnische Oberschule, Perleberg
 09/1991 - 08/1993 Gymnasium "Gottfried Arnold", Perleberg,
 Erlangung der Allgemeinen
 Hochschulreife

Studium der Medizin: 10/1993 Immatrikulation an der Humboldt-Universität Berlin
 09/1995 Ärztliche Vorprüfung
 08/1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 04/1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 06/2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr: 04/1999 – 03/2000
 1. Tertial: Innere Medizin: St. Hedwig Krankenhaus, Berlin
 2. Tertial: Orthopädie: Kantonsspital Winterthur, Schweiz
 3. Tertial: Chirurgie: Parkklinik Weissensee, Berlin

Beruflicher Werdegang: 17.07.2000 - 31.08.2001 Arzt im Praktikum im Krankenhaus
 Moabit Berlin, Abteilung für Chirurgie
 01.09.2001 - 16.01.2002 Arzt im Praktikum und seit dem
 17.01.2002 Assistenzarzt im
 Evangelischen Krankenhaus Königin
 Elisabeth Herzberge Berlin, Abteilung
 für Chirurgie

Berlin, den 29.07.2003

Christian Böwe

Danksagung

Herrn Professor Dr. Dr. Ulf B. Göbel danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut wissenschaftlich zu arbeiten.

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. Thomas Adam für die Überlassung des Themas der Arbeit sowie die hervorragende fachliche Betreuung sowohl während der Laborarbeit als auch bei der Erstellung der Dissertation aussprechen. Er war ein geduldiger Tutor, ein konstruktiver Kritiker und stets für Rückfragen ansprechbar. Das freundschaftliche Verhältnis zu Herrn Dr. Adam sowie das angenehme Arbeitsklima in der gesamten AG waren der Garant für das Gelingen dieser Arbeit.

Herzlich bedanke ich mich auch bei meinen Eltern, die stets Vertrauen in mich setzten und auf deren uneingeschränkte Unterstützung ich mich immer verlassen konnte.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 29.07.2003
Christian Böwe